

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD — LYON (I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1976 - N° 126

**Application des méthodes d'électrophorèse
et d'électrofocalisation à quelques problèmes
de Chimiotaxonomie et de Biologie**

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 16 novembre 1976

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

DEBOURCIEU Louis

né le 23 octobre 1927

à LYON

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON III
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1976 - N° 124

Application des méthodes d'électrophorèse
et d'électrofocalisation à quelques problèmes
de Chimiotaxonomie et de Biologie

THÈSE

présentée

À L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 16 novembre 1976
pour obtenir le grade de Docteur d'État en Pharmacie

par

DEBOURCIEU Louis

né le 23 mars 1952

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD — LYON (I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1976 · N° 126

**Application des méthodes d'électrophorèse
et d'électrofocalisation à quelques problèmes
de Chimiotaxonomie et de Biologie**

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD · LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 16 novembre 1976
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

DEBOURCIEU Louis

né le 23 octobre 1927

à LYON

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON III
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACIQUES

ANNÉE 1976 - N° 126

Application des méthodes d'électrophorèse et d'électrocalorimétrie à quelques problèmes de Chimiotaxonomie et de Biologie



THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 10 novembre 1976
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

DEBOURCIEU Louis

né le 23 octobre 1957

A LYON

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M.C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M.J. RAMBAUD, Administrateur Civil

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (U.E.R.)

U.E.R. Médicale GRANGE-BLANCHE : M. le Docteur B. SALLE, Maître de Conférences Agrégé

U.E.R. Médicale ALEXIS-CARREL : Monsieur le Professeur C. GIROD

U.E.R. Médicale LYON-NORD : M. le Professeur J.P. GARIN

U.E.R. Médicale SUD- OUEST : M. le Professeur J. ROBERT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : M. le Professeur L. ODDOUX

U.E.R. des Techniques de Réadaptation : M. A. MORGON, Maître de Conférences Agrégé

U.E.R. de Biologie Humaine : M. le Professeur J.C. CZYBA

U.E.R. d'Education Physique et Sportive : M. A. MILLON, Professeur D'E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques : M. le Docteur R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : M. le Professeur G. MAURY

U.E.R. de Physique : M. le Professeur R. UZAN

U.E.R. de Chimie et Biochimie : M. le Professeur J. HUET

U.E.R. des Sciences de la Nature : M. le Professeur J. BRUN

U.E.R. de Sciences Physiologiques : M. R. FONTANGES, Maître de Conférences Agrégé

U.E.R. de Physique Nucléaire : M. le Professeur A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique : M. le Professeur J. MATHIEU

I.U.T. 1 : M. le Professeur B. POUYET

I.U.T. 2 : M. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Observatoire de LYON : M. le Professeur J.H. BIGAY

PLAN GÉNÉRAL

1) GÉNÉRALITÉS

L'évolution des méthodes de séparation systématiques

2) Chapitre I - Les techniques : électrophorèse et électro-focalisation

3) Chapitre II - APPLICATION DES METHODES D'ELECTROPHORESE ET

4) Chapitre III - D'ELECTROFOCALISATION A QUELQUES PROBLEMES DE

CHIMIOTAXONOMIE ET DE BIOLOGIE

5) Chapitre IV - Application de l'électro-focalisation à la systématique de quelques Coléoptères

6) Chapitre V - Application de l'électrophorèse et de l'électro-focalisation à la systématique de quelques Arthropodes

7) Chapitre VI - Application de l'électro-focalisation à la systématique de quelques Invertébrés

Conclusion générale

Bibliographie



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554226_0033

PLAN GENERAL

1) GENERALITES

L'évolution des méthodes en Botanique systématique.

- 2) Chapitre I : Les Techniques : Electrophorèse et Electro-focalisation.
- 3) Chapitre II : Etat des travaux concernant les Procaryotes.
- 4) Chapitre III : Application de l'électrophorèse et de l'électro-focalisation à la systématique des Pezizales.
- 5) Chapitre IV : Application de l'électro-focalisation à la systématique de quelques Coniférales.
- 6) Chapitre V : Application de l'électrophorèse et de l'électro-focalisation à la systématique de quelques Angiospermes.
- 7) Chapitre VI : Application de l'électro-focalisation à la génétique moléculaire : étude de quelques variants de l' α_1 anti-trypsine sérique.

Conclusions générales.

Conclusion.

S O M M A I R E

=====

GENERALITES : L'évolution des méthodes en Botanique systématique	9
---	---

CHAPITRE I : LES TECHNIQUES : Electrophorèse et Electrofo- calisation.

1 - L'électrophorèse en veine liquide	16
2 - L'électrophorèse de zone :	
2.1. Electrophorèse sur papier	17
2.2. Electrophorèse sur plaque d'acé- tate de cellulose	17
2.3. Electrophorèse sur gel d'amidon.	17
2.4. Electrophorèse sur gel de poly- acrylamide	17
2.4.1 Réactifs employés	19
2.4.2 Préparation des gels	20
2.4.2.1. Gel inférieur	20
2.4.2.2. Gel intermédiaire.	21
2.4.2.3. Gel supérieur	21
2.4.3 Electrophorèse	22
2.4.4 Séparation et coloration des gels	22
2.4.5 Décoloration des gels	22
2.4.6 Conservation des gels	22
2.4.7 Lecture des protéinogrammes	23
2.4.8 Sensibilité de la méthode: le problème du dosage des protéines	23
2.4.8.1. Méthode du Biuret	23
2.4.8.2. Méthode de Lowry..	23
2.4.8.3. Méthode de Bramhall et Loewenberg	24
-Principe de la méthode	24
-Modifications apportées: préparation des solu- tions protéiques	24
Le dosage	25

Conclusions relatives à la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide	28
2.5. Les techniques d'électrofocalisation :	
2.5.1 Notions théoriques sur l'électrofocalisation	29
2.5.1.1 La migration dans un gradient de pH	29
2.5.1.2. Le gradient de pH	31
2.5.1.3. Propriétés des ampholines:	34
-Les gammes de pH	34
-Propriétés physico-chimiques	34
2.5.1.4. Les supports de migration.	35
2.5.2 Techniques employées :	35
2.5.2.1. L'électrofocalisation sur colonne :	36
-Matériel utilisé	36
-Le gradient de densité ..	36
-Conditions thermiques ...	36
-Réalisation de l'électrophorèse	36
-Elution et dosage	38
2.5.2.2. Electro-focalisation sur couche mince de gel	38
-Les solutions pour obtention du gel	38
-La préparation du gel ...	40
-La polymérisation du gel.	41
-La conservation du gel ..	41
-Les solutions d'électrodes	41
-Les conditions thermiques	41
-Le dépôt des prélèvements	41
-L'électrophorèse	42
-La coloration du gel	42
-La décoloration du gel...	42
2.5.3 Problèmes posés par la présence des polyphénols	44
-Cas de l'électrofocalisation sur colonne	45
-Cas de l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide	45

CHAPITRE II : ETAT DES TRAVAUX CONCERNANT LES PROCARYOTES ...	47
CHAPITRE III: APPLICATION DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL ET DE L'ELECTROFOCALISATION A LA SYSTEMATIQUE DES PEZIZALES	
1 - Travaux antérieurs	49
2 - Discussion sur les travaux précédents	51
3 - Recherches personnelles	52
3.1. Raison du choix des Pezizales	52
3.2. Position systématique des Pezizales	53
3.3. Les espèces étudiées et leur provenance	54
3.4. Obtention des mycéliums	59
3.5. Préparation des extraits mycéliens.	59
3.6. Réalisation des gels de polyacryla- mide pour électrophorèse simple ...	60
3.7. Emploi de l'électrofocalisation sur colonne d'ampholines	60
3.8. Emploi de l'électrofocalisation sur couche mince	60
3.9. Résultats obtenus :	
3.9.1 Comparaison des trois méthodes d'électrophorèse	61
3.9.2 Comparaison des différentes espèces de Pézizales étudiées par la technique d'électrofo- calisation sur colonne d'am- pholines	87
3.9.2.1 Comparaison entre les 4 souches de <i>Morchella</i>	87
3.9.2.2 Comparaison entre <i>Dis-</i> <i>ciotis venosa</i> et <i>Verpa digitaliformis</i>	88
3.10. Précisions apportées par la focali- sation sur couche mince de polyacry- lamide	89
3.10.1 Résultats	89
3.10.2 Discussion	89
3.11. Comparaison des six espèces de Pézizales d'après les amino-acides libres	94
3.11.1 Techniques employées	95
3.11.2 Discussion	96
4 - Conclusion	97

CHAPITRE IV : APPLICATION DE L'ELECTROFOCALISATION SUR COUCHE MINCE DE
POLYACRYLAMIDE A LA SYSTEMATIQUE DE QUELQUES GYMNOSPERMES

1 - Etat des travaux de Systématique macromoléculaire appliqués aux Gymnospermes	100
2 - Recherches personnelles	100
2.1. Raison du choix des graines de Coniférales	100
2.2. Position systématique des Coniférales ..	101
2.3. Description des espèces étudiées	101
2.4. La préparation des extraits de graines .	104
2.5. Conditions d'emploi de l'électro-focali- sation sur couche mince de polyacrylamide	104
2.6. Comparaison de quelques Abiétacées d'a- près leurs protéinogrammes	104
2.6.1 Les résultats	104
2.6.2 Interprétation de ces protéino- grammes	106
3 - Conclusion	108

CHAPITRE V : APPLICATION DE L'ELECTROFOCALISATION SUR COLONNE
ET SUR COUCHE MINCE DE POLYACRYLAMIDE A LA SYSTE-
MATIQUE DE QUELQUES ANGIOSPERMES

1 - Etat des travaux de Chimiotaxonomie macromolé- culaire appliqués aux Angiospermes ..	
1.1. Travaux effectués sur des racines	119
1.2. Travaux effectués sur des tubercules ...	119
1.3. Travaux effectués sur des feuilles	120
1.4. Travaux effectués sur des graines	
1.4.1. Les graines de monocotylédones .	121
1.4.2. Les graines de dicotylédones ...	122
2 - Commentaire de ces travaux	124
3 - Recherches personnelles	
3.1. Raison du choix des graines de Solana- cées	125
3.2. Position systématique des Solanacées....	125
3.3. Description des espèces étudiées	126
3.4. Préparation des extraits de graines pour l'électro-focalisation sur colonne	130
3.5. Préparation des extraits de graines pour l'électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide	131

3.6. Comparaison de cinq espèces du genre <i>Datura</i> par électrofocalisation sur colonne	131
3.6.1 Les résultats obtenus	131
3.6.2 Discussion des résultats	132
3.7. Comparaison de cinq espèces du genre <i>Datura</i> par électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide : Les précisions apportées par cette méthode .	
3.7.1. Les résultats obtenus	147
3.7.2. Discussion des résultats	152
3.8. Détermination des acides aminés libres des graines de quatre espèces du genre <i>Datura</i> Comparaison des résultats	
3.8.1 Extraction	154
3.8.2 Dosage	154
3.8.3 Résultats	154
3.8.4 Comparaison des résultats	155
3.9. Comparaison de six Solanacées par électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide	
3.9.1 Résultats obtenus	157
3.9.2 Discussion des résultats	162
4 - Conclusion	163

CHAPITRE VI : APPLICATION DE L'ELECTROFOCALISATION SUR COUCHE MINCE DE POLYACRYLAMIDE A UN PROBLEME DE GENETIQUE MOLECULAIRE : LES VARIANTS DE L' α_1 ANTI-TRYPSINE SERIQUE

1 - Les inhibiteurs de protéases	167
2 - Les caractères biochimiques de l' α_1 anti-trypsine	168
3 - Les méthodes d'étude de l' α_1 anti-trypsine ..	169

3.1 Détermination de la concentration sérique en α_1 anti-trypsine	169
3.2 Détermination de l'activité anti-trypsique	170
3.3 Les méthodes d'électrophorèse	170
3.3.1 Electrophorèse sur gel d'agar	171
3.3.2 Cross électrophorèse	171
3.3.3 Electrophorèse sur gel d'amidon ..	171
3.3.4 Electro-focalisation	171
3.4 Concordance des trois méthodes	172
4 - Génétique de l' α_1 anti-trypsine :	
Le système Pi	
4.1 Caractère Mendelien de la transmission de l' α_1 anti-trypsine	172
4.2 Les allèles responsables de la transmission	173
4.3 Le système Pi ("protease inhibitor")	173
4.3.1 Les bases du système Pi	174
4.3.2 Les variants principaux du système Pi	174
4.3.3 Les variants rares du système Pi ..	177
4.3.4 Les variants exceptionnels du sys- tème Pi	177
4.3.5 Le variant Pi^- dans le système Pi.	177
4.4 La répartition des variants du système Pi.	179
4.5 Les problèmes posés par la génétique du système Pi	181
4.6 Les phénotypes du système Pi et la patho- logie	183
4.6.1. Les phénotypes du système Pi et les maladies hépatiques	183
4.6.2. Les phénotypes du système Pi et les maladies respiratoires	184
5 - Recherches personnelles	186
5.1 Techniques employées	186

5.1.1 Détermination de la concentration sérique en α_1 anti-trypsine	186
5.1.2 Détermination des phénotypes par électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide	186
5.2 Matériel employé	186
5.3 Résultats globaux	187
5.4 Cas intéressant la pathologie	191
5.4.1 Le phénotype MZ	191
5.4.2 Le phénotype peu connu	191
6 - Conclusion	192
CONCLUSIONS GENERALES	194
CONCLUSION ;.....	198
BIBLIOGRAPHIE	199

I N T R O D U C T I O N

=====

A toutes les époques de son histoire, la Botanique a manifesté, comme les autres Sciences de la Nature un souci de description et de classification. A l'origine elle a cherché surtout à déterminer les plantes alimentaires, médicinales et toxiques. Plus tard des préoccupations théoriques sont apparues; elles ont tenté d'établir des relations entre les ensembles que l'empirisme avait pu constituer. Toutes les classifications fondées uniquement sur la morphologie externe aboutissent à des systèmes artificiels fréquemment remaniés. Ces contradictions ont été fécondes et l'on a pu dire que la Botanique Systématique était une synthèse indéfinie.

Au XIXe Siècle le concept d'Evolution, issu des travaux de DARWIN ,et le concept de distribution statistique des caractères phénotypiques, fondé sur les recherches de MENDEL ont été particulièrement enrichissants en Botanique.

Le concept d'évolution a permis d'établir des classifications "verticales", dans lesquelles la phylogénie introduira des rapprochements ou des oppositions significatifs.

Le concept de distribution des caractères phénotypiques a précisé avec rigueur la notion d'espèce (notion basée davantage sur les discontinuités que sur les ressemblances) et a permis un recours constant à l'expérimentation. La Systématique aura recours à des disciplines complémentaires comme l'histologie, l'embryologie, la cytologie structurale et ultra-structurale, l'écologie et la chimie. ALSTON (5) et TURNER (128) en 1967

distinguent dans l'histoire de la Taxonomie la période macromorphologique, la période micromorphologique, la période évolutioniste, la période biochimique.

La période macromorphologique commence avec les observations d'ARISTOTE et s'achève à la fin de la Renaissance. Elle repose sur des méthodes purement descriptives basées uniquement sur la morphologie externe.

La période micromorphologique lui succède. Elle commence avec la découverte du microscope et s'achève en 1859 lors de la publication par DARWIN de "L'Evolution des Espèces".

La période évolutioniste est la période phylogénique. Elle se poursuit actuellement. Riche en orientations nouvelles, elle a coïncidé constamment avec les découvertes de la génétique puis de la cytogénétique.

La période biochimique commence vers 1960. Les mises au point sur les travaux de chimiotaxonomie vont se multiplier. Nous citerons entre autre celle de HEGNAUER en 1962 (67) et celle de MIEGE (103) en 1968. Le premier numéro de la revue "Phytochimie" paraît en 1961.

Le développement des méthodes chromatographiques, électrophorétiques et spectrométriques (U.V., visible, infrarouge, masse, R.M.N.) explique l'importance des résultats déjà obtenus lors de cette période chimiotaxonomique.

Nous pouvons distinguer dans cette période la voie micromoléculaire et la voie macromoléculaire. Cette distinction doit cependant être appliquée avec prudence car les limites de poids moléculaire ont été choisies arbitrairement.

La chimiotaxonomie micromoléculaire est apparue la première. Actuellement de nombreux travaux étudient la distribution de molécules relativement simples dans divers groupes végétaux. Les composés les plus étudiés sont les acides aminés, les alcaloïdes, les terpénoïdes et les flavonoïdes. Ces composés sont largement répandus dans le monde végétal, mais certains d'entre eux sont plus spécifiques de certaines familles. Cependant, il arrive qu'une molécule soit décelée dans des groupes sans lien systématique apparent. Son apparition est davantage le reflet de fluctuations métaboliques que celui de la phylogénie ou d'une homologie génique. Nous citerons comme exemples : la bufoténine, la nicotine et la coniine.

- La bufoténine, alcaloïde du groupe tryptaminique, se rencontre chez le crapaud, chez les champignons du genre *Desmodium* et chez des phanérogames du genre *Phalaris*.
- La nicotine est un alcaloïde commun au genre *Nicotiana* (Solanacées) et au genre *Equisetum* (Equisétacées).
- La coniine, alcaloïde produit par *Conium maculatum* (Ombellifères), a été mise en évidence chez *Sedum sarmentosum* (Crassulacées).

La systématique micromoléculaire doit également tenir compte de la variation des phénotypes en fonction du milieu extérieur. Ainsi la composition en terpènes des bourgeons de diverses espèces du genre *Pinus* présente des variations selon la saison. Nous dirons avec HEYWOOD (69) que ces réserves rendent indispensables la confrontation des caractères chimiques à ceux de la taxonomie classique.

Une excellente méthode de contrôle consiste à réaliser des hybridations. C'est ainsi qu'ALSTON et TURNER (4) ont comparé par chromatographie les flavonoïdes de trois espèces pures et d'un hybride du genre *Baptisia*. La présence d'un flavonoïde est commandée généralement par un gène dominant; les chromatogrammes d'hybrides sont le résultat d'un effet additif. L'ascendance exacte de l'hybride a été déterminée en utilisant les résultats des études morphologiques et chromatographiques.

Nous remarquerons que les techniques d'hybridations n'impliquent pas l'identification des composés révélés sur le chromatogramme. Cette identification devient par contre indispensable en phylogénétique.

La chimiotaxonomie macromoléculaire peut utiliser toute macromolécule dont la biosynthèse est sous commande génétique directe. En fait elle est essentiellement basée sur la séparation, la comparaison et éventuellement l'identification des protéines solubles d'un matériel végétal. Mais GIBBS en 1963 (56) et les premiers chercheurs se sont montrés assez réticents sur l'emploi des protéines solubles en chimiotaxonomie. Nous pensons que ces réticences reposent sur :

- la labilité des protéines
- leur répartition : ces protéines sont soit trop communes soit trop rares pour être utiles en systématique
- la connaissance de leur structure : elle est peu connue, contrairement à celle des protéines animales. Peu d'analyses de séquence ont été effectuées sur des protéines végétales. Elles n'ont été menées à bien que pour les cytochromes C par DICKERSON (37) , BOULTER et coll. (16) ou pour les phytohémagglutines comme la concavoline A par EDELMAN (42)

Il est certain qu'en ce domaine il ne sera pas possible, avant longtemps, de remonter de la molécule programmée : la protéine, à son programmeur : l'A D N, comme cela a été fait pour des bactéries ou des virus.

Quoiqu'il en soit, les protéines représentent pour le systématique des molécules privilégiées. Elles sont l'expression directe du génotype et le support du phénotype.

Deux types de méthodes sont essentiellement appliquées en chimiotaxonomie macromoléculaire. Ce sont :

- les méthodes sérologiques : ALSTON et TURNER (4) en ont fait le bilan en 1963. Elles sont actuellement complémentaires des méthodes d'électrophorèse.

- les méthodes d'électrophorèse et d'électrofocalisation : nous nous sommes proposé d'appliquer ces méthodes à divers problèmes de systématique. Le matériel choisi est très varié. Nous avons utilisé successivement des Cryptogames avec les Pezizales, des Gymnospermes avec la famille des Conifères, des Angiospermes avec la famille des Solanacées. Enfin dans une dernière partie nous avons appliqué ces méthodes en Biologie cellulaire en envisageant l'étude de l' α_1 anti-trypsine sérique.

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans les conseils de Monsieur le Professeur G. NETIEN. Sa grande expérience de la Systématique nous a guidé dans le choix et la détermination des Gymnospermes et des Angiospermes que nous avons étudiés.

Monsieur le Professeur G. DEYSSON nous a fait l'honneur de participer à ce Jury. Sa compétence en Biologie cellulaire l'appelait à juger un travail de Chimiotaxonomie. Qu'il veuille bien accepter nos respectueux remerciements.

Nous associons à nos remerciements Monsieur le Professeur J. ROBERT. Nous avons suivi son enseignement au Certificat de Génétique humaine générale. Il a su nous sensibiliser aux problèmes actuels de la Génétique moléculaire.

Monsieur le Professeur R. MOREAU nous a suggéré l'orientation générale de ce travail. Il nous a toujours prodigué des conseils éclairés et amicaux. Notre gratitude lui est acquise.

Nous ne saurions oublier la constante attention que Monsieur J. RAYNAUD nous a témoignée. Ses remarques nous ont été précieuses.

Monsieur le Professeur BERTHET nous a fourni les souches de Pézizales que nous avons étudiées. Nous l'associons à nos remerciements.

Nous voudrions exprimer notre reconnaissance au Docteur GIBAUD. Il a bien voulu nous recevoir dans son service de Chimie Biologique du C.H.U. de SAINT ETIENNE et nous donner conseils et encouragements.

Nous pensons enfin à nos collègues du Laboratoire de Botanique et à l'ambiance amicale qu'ils surent établir.

CHAPITRE I

LES TECHNIQUES : ELECTROPHORESE ET ELECTROFOCALISATION

Le terme d'électrophorèse, introduit vers 1907 par MICHAELIS désigne le phénomène de migration des particules colloïdales sous l'effet d'un champ électrique.

Trente ans plus tard, le premier appareillage en veine liquide est mis au point par Arne TISELIUS. Les développements de la technique suivent ensuite les perfectionnements de la chromatographie. L'emploi de supports en papier permet l'extension du procédé aux petites molécules. Enfin, d'autres supports, plus ou moins inertes, seront essayés ; la plupart feront intervenir de nouveaux facteurs de résolution, superposés à la simple migration électrophorétique.

1) ELECTROPHORESE EN VEINE LIQUIDE

Les premiers essais de TISELIUS mettent en jeu une cellule à section rectangulaire, thermostatée, et couplée à un système optique pour évaluer les variations d'indice de réfraction au niveau de chaque frontière protéique. Ils aboutirent à la définition de la mobilité électrophorétique, c'est-à-dire de la vitesse de migration rapportée à l'unité de champ électrique.

Mais cette méthode présente plusieurs inconvénients :

- le prix élevé de l'appareillage
- l'emploi strictement réservé aux protéines, car on ne peut obtenir de frontières repérables avec de petites molécules par suite de leur trop grande diffusion
- le pouvoir résolutif faible.

2) ELECTROPHORESE DE ZONE : Figure 1

2.1. Electrophorèse sur papier

L'électrophorèse sur papier fut la première des électrophorèses de zone. Après migration, les bandes protéiques sont révélées par des colorants spécifiques.

2.2. Electrophorèse sur plaque d'acétate de cellulose

L'électrophorèse sur plaque d'acétate de cellulose est plus rapide et plus résolutive. Les résultats obtenus par cette méthode sont qualitativement analogues à ceux de l'électrophorèse en veine liquide. Mais la détermination des mobilités électrophorétiques est pratiquement impossible car des forces diverses, en particulier les flux d'électro-osmose, interviennent dans les vitesses de déplacement.

2.3. Electrophorèse sur gel d'amidon (123)

L'électrophorèse sur gel d'amidon fut mise au point vers 1955 par SMITHIES. Le support a pour effet de créer un tamisage moléculaire des protéines. A un pH donné, deux protéines de même mobilité électrophorétique seront séparées si elles diffèrent par leur poids moléculaire : la plus petite migrera davantage. Cette méthode est largement utilisée, malgré la difficulté de préparation du gel. Nous verrons qu'elle sert de référence pour la définition d'un système génétique : le système Pi de l' α Anti-trypsine. Mais elle est peu à peu supplantée par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Cette technique, très résolutive, utilise de petits tubes cylindriques remplis de gel de polyacrylamide. Nous avons eu l'occasion de l'employer dans ce travail et de la comparer avec les techniques plus récentes d'électrofocalisation. La réalisation des gels est relativement délicate et nous avons dû adopter le protocole suivant :

Figure n° 1

ELECTROPHORESE (d'après un document L K B)

2.4.1 Réactifs employés

Solution A : Acide chlorhydrique normal 48 ml
 Tris^{*} 36,6 g
 Temed^{**} 0,23 ml
 eau q s p 100 ml

Solution B : Acide chlorhydrique normal 48 ml
 Tris 5,98 g
 Temed 0,46 ml
 eau distillée q s p 100 ml

Solution C : Acrylamide 7,5 g
 Bis^{***} 0,2 g
 eau q s p 25 ml

Solution D : Acrylamide 5 g
 Bis 1,25 g
 eau q s p 25 ml

Solution E :
Pour gel inférieur
 Temed 0,32 ml
 eau q sp 100 ml

Pour gels intermédiaire et supérieurs

Riboflavine 4 mg
 eau q s p 100 ml

Solution F : saccharose 40 g
 eau distillée q s p 100 ml

* Tris : N N' méthylène bis acrylamide

** Temed : N N N'N' tétraméthyléthylène diamine

*** Bis : N,N' méthylène bis acrylamide

Solution G : persulfate d'ammonium 0,14 g
eau distillée q s p 100 ml

Solution H :
Tampon d'électrophorèse (à pH 8,6)
Tris 6 g
Glycocolle 28,8 g
eau q s p 100 ml
bleu de bromophénol 10 % 1 goutte

Colorant pour gels :
Noir d'aniline 0,3 g
acide acétique à 7 % 100 ml

2.4.2 Préparation des gels

Douze tubes préalablement lavés au mélange sulfochromique sont passés intérieurement au column coat Canalco, ce qui permet un démoulage plus aisé des gels après polymérisation.

2.4.2.1. Préparation du gel inférieur de pH : 8,9

8 ml de solution pour gel inférieur sont obtenus en mélangeant les solutions suivantes :

. Solution A	1 ml
. Solution C	2 ml
. Solution E	1 ml
. Solution G	4 ml

et on additionne 2,88 g d'urée pour le rendre 6 M.

Le mélange est introduit dans les tubes à l'aide d'une seringue munie d'un tuyau fin et souple (l'emploi d'une aiguille s'avère moins pratique). Sur la surface parfaitement plane, nous introduisons à la seringue de l'eau distillée pour former un disque de surface.

Les tubes sont alors laissés trente minutes sous rampe U.V., puis renversés et séchés sur papier buvard.

2.4.2.2. Préparation du gel intermédiaire de pH : 6, à 6,8

Ce gel est préparé par mélange des solutions suivantes :

- . Solution B 1 ml
- . Solution D 1 ml
- . Solution E 1 ml
- . Solution F 4 ml
- . eau distillée 1 ml

Un rinçage préalable des tubes avec ce mélange s'avère indispensable. Nous introduisons 1 ml de cette solution dans chaque tube, puis de l'eau distillée pour former un disque de surface.

La polymérisation est conduite trente minutes sous rampe U.V. Elle est suivie d'un séchage sur papier buvard.

2.4.2.3. Préparation du gel supérieur de pH voisin de

Nous préparons 8 ml de solution en mélangeant :

- . Solution B 1 ml
- . Solution D 2 ml
- . Solution E 1 ml
- . Eau distillée 4 ml

et nous les introduisons dans les tubes en même temps que l'extrait protéique étudié. Les proportions sont les suivantes :

- . mélange pour gel supérieur : 0,1 ml
- . solution protéique : 0,1 ml

Nous recouvrons la partie supérieure des tubes d'un anneau de paraffine et nous pouvons alors les renverser pour effectuer le mélange.

La polymérisation est conduite une heure et demie sous rampe U.V.

2.4.3. Electrophorèse

L'électrophorèse a été effectuée avec un appareil Canalco. Chaque tube a été complété jusqu'à formation d'un ménisque à l'aide de tampon pour électrophorèse (solution H) coloré par le bleu de bromophénol, qui va servir de traceur. La cuve supérieure de l'appareil est remplie du même tampon coloré. La cuve inférieure contient le tampon non coloré.

L'électrophorèse est réalisée sous 5 mA par tube.

La migration s'effectue de haut en bas. L'opération est achevée quand le front coloré en bleu est à environ 0,5 cm de l'extrémité inférieure du tube. La durée moyenne de migration est de deux heures.

2.4.4. Séparation et coloration des gels

Les gels sont expulsés de leur tube par injection d'eau à la seringue. Ils sont plongés dans une solution d'amido black à 1 %. La coloration se développe en étuve à 30°, pendant une heure.

2.4.5. Décoloration des gels

Principe : l'acide acétique à 7 % fixe les gels et permet après 15 minutes de contact un début de décoloration du fond. En pratique, même des temps de contact plus longs n'assurent pas une décoloration convenable. Celle-ci ne sera obtenue que par utilisation d'une électrophorèse sur appareil Canalco.

2.4.6. Conservation des gels

La conservation des gels est excellente dans l'acide acétique à 7 %. Cependant, nous avons constaté au bout de six mois un élargissement de la plupart des bandes, dû sans doute à la diffusion du colorant.

2.4.7. Lecture des protéinogrammes

La lecture s'effectuera soit après photographie des gels suivie d'un agrandissement. Pour les bandes nettes, il sera possible de leur affecter une valeur de R_f ,

soit par densitométrie avec un appareil Chromoscan. C'est la méthode que nous avons adoptée.

2.4.8. Sensibilité de la méthode

Nous avons pu vérifier que les conditions optimales exigent une concentration protéique comprise entre 200 et 250 gammas pour 0,1 ml, soit entre 2 g et 2,5 g par litre d'extrait.

C'est pourquoi, nous avons procédé à un dosage préalable des protéines. Ce dosage dans les extraits végétaux nous a posé des problèmes. Quant à la méthode à utiliser nous envisageons 3 techniques :

2.4.8.1. Méthode du biuret

Elle est en général inapplicable en raison des concentrations insuffisantes des extraits végétaux; de plus la coloration est également obtenue avec des substances dépourvues de liaisons peptidiques.

2.4.8.2. Méthode de LOWRY (94)

La méthode est beaucoup plus sensible que la précédente; elle repose sur la coloration bleue développée par les protéines en présence du réactif de FOLIN. Cette coloration dépend essentiellement de la fonction phénolique de la tyrosine; mais le tryptophane, la cystéine et l'histidine interviennent également. Nos conditions expérimentales n'ont pas permis l'utilisation de cette méthode pour deux raisons:

La première :

- Le réactif de Folin est sensible aux constituants des tampons d'extraction, en particulier le TRIS. Les colorations sont 5 à 10 fois moins nettes que celles obtenues avec des témoins sans TRIS.

La seconde :

- Le réactif interfère avec les polyphénols, les phénols, les glucides qui demeurent toujours dans les extraits végétaux malgré les purifications préalables que nous avons pu réaliser.

2.4.8.3. Méthode de BRAMHALL et LOEWENBERG (17)

Principe : une quantité aliquote de solution protéique est déposée sur un carré de papier Whatman sans cendres et fixée par l'acide trichloracétique. L'excès d'acide est éliminé puis la coloration est assurée par le xylène brillant cyanine B ou le naphtalène blue black de Gurr.

Après lavage et élution, une lecture est effectuée au spectrophotomètre.

Modification de la méthode de BRAMHALL et LOEWENBERG : L'application stricte de la méthode nous a d'abord donné des résultats décevants. Nous l'avons reprise point par point pour la rendre reproductible dans nos conditions de travail, si bien que le dosage que nous avons employé n'a plus que son principe en commun avec celui des auteurs américains. Nous avons standardisé les conditions d'élution des complexes ce qui n'avait pas été précisé par BRAMHALL en 1969.

Préparation des solutions protéiques :

Nous déposons sur des rondelles de papier Whatman 42 0,1 ml de solution protéique.

Chaque tache est découpée puis introduite dans un tube à essai de fort calibre, contenant 4 ml d'acide trichloracétique à 7,5 %.

Nous hydrolysons ensuite au bain-marie à 80°C pendant trente minutes; une fois la solution acide éliminée nous procédons à deux lavages successifs :

- d'abord par un mélange d'éther éthylique et de méthanol (v/v)
- puis à l'éther éthylique pur.

A ce stade il est possible de conserver les papiers pendant quelques jours avant de procéder au dosage.

Dosage :

Deux cas sont à envisager :

Premier cas

La solution contient de 5 à 25 gammas de protéines:

Nous ajoutons aux tubes contenant les papiers précédents 2 ml de solution de xylène brillant cyanin G (10 mg/ml d'acide acétique à 7 %)

Nous laissons 15 minutes à 50°C en agitant de temps en temps.

L'excès de colorant est éliminé par l'acide acétique à 7 % jusqu'à obtention d'un fond blanc; il faut au moins 5 lavages de 15 minutes pour obtenir ce résultat.

Le papier est ensuite découpé puis introduit dans 5 ml de solution éluante : méthanol 6,6 ml, eau 34 ml, ammoniacale 1 ml.

Après une heure à température ordinaire, nous procédons à la lecture au photomètre à 610 nm.

Second cas

La solution contient de 50 à 200 gammas de protéines:

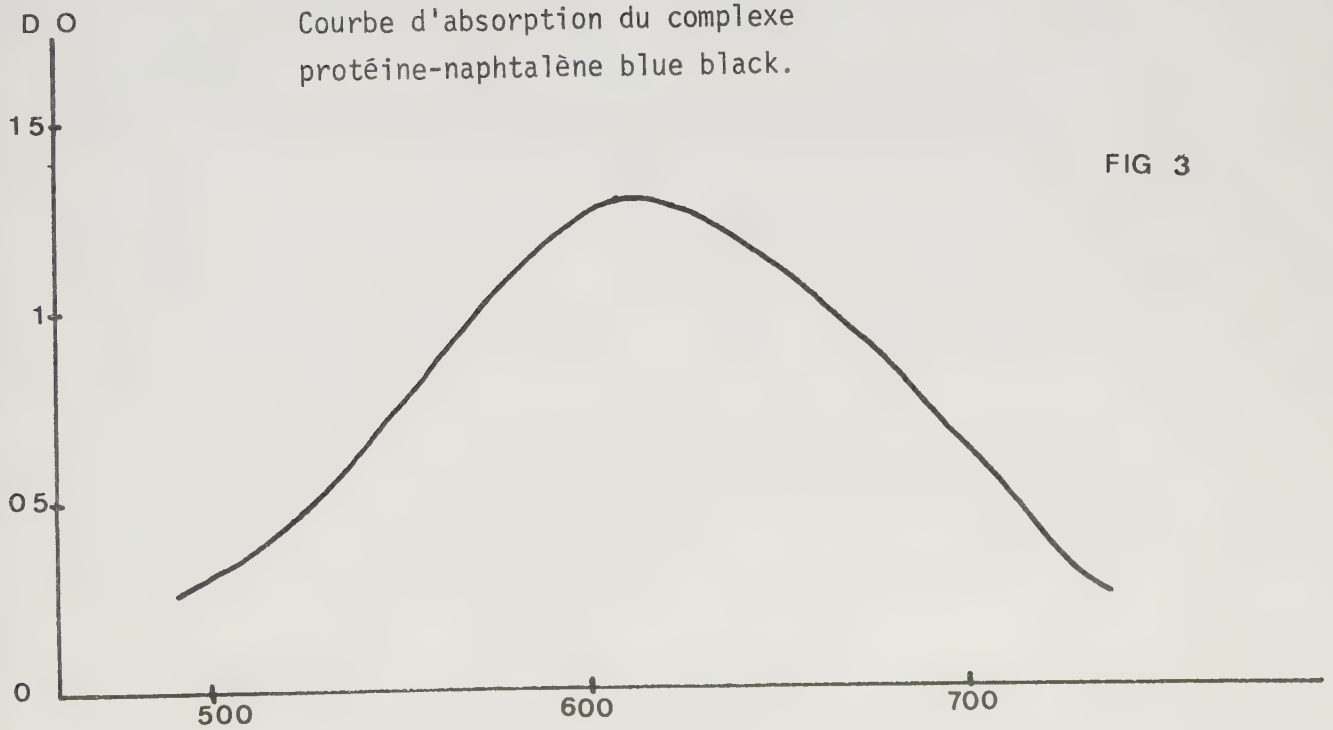
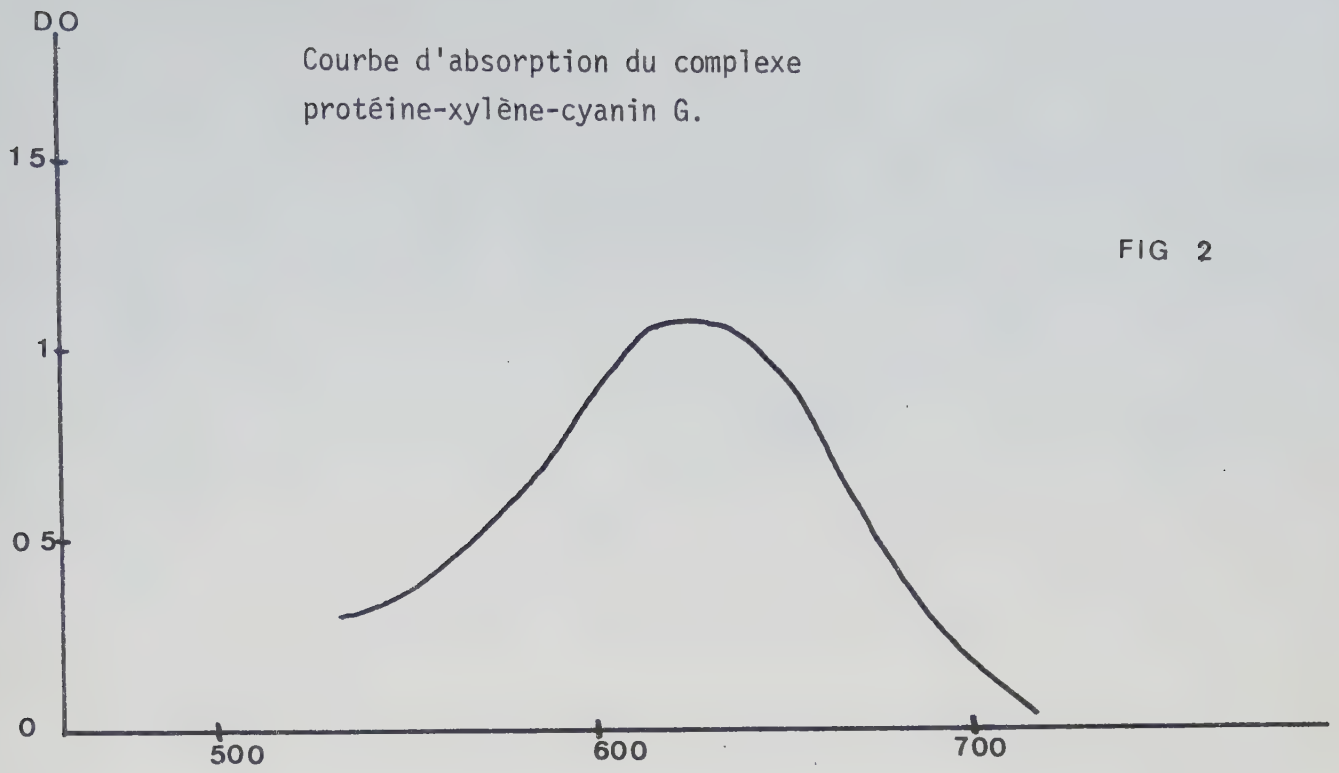
La technique de coloration se fait à 50°C pendant 15 minutes avec 2 ml de solution de naphthalène blue black (10 mg dans 1 ml d'un mélange acide acétique, méthanol, eau (1 v - 4 v - 5 v)).

Après rinçage comme dans le premier cas, l'élution se fait avec 5 ml de soude 0,05 N pendant une heure à température ordinaire.

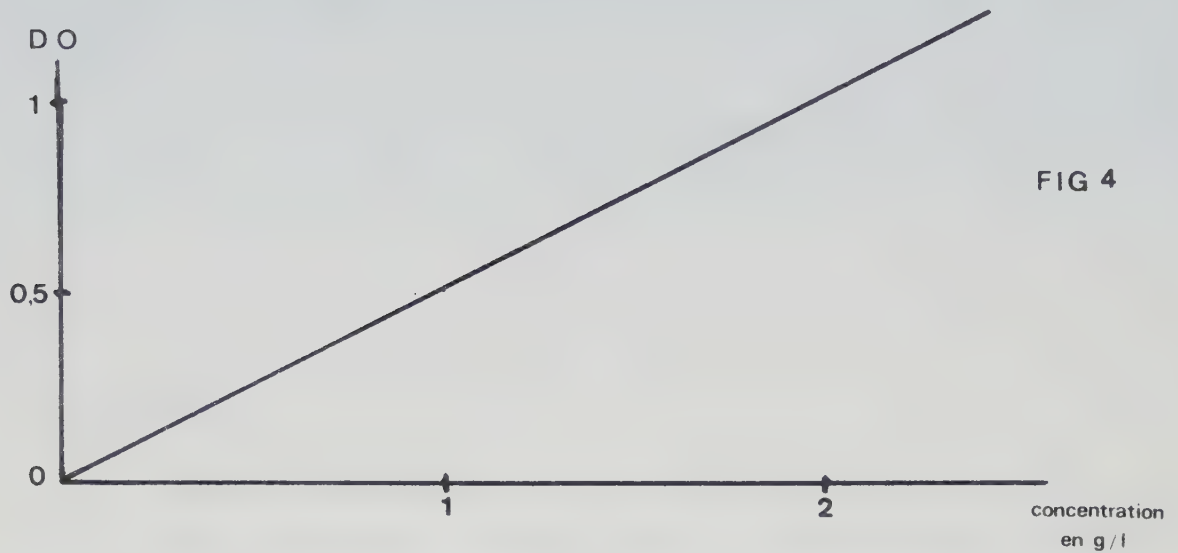
La coloration est lue au photomètre à 620 nm.

Les courbes d'absorption des deux types de complexes sont représentées sur les figures 2 et 3.

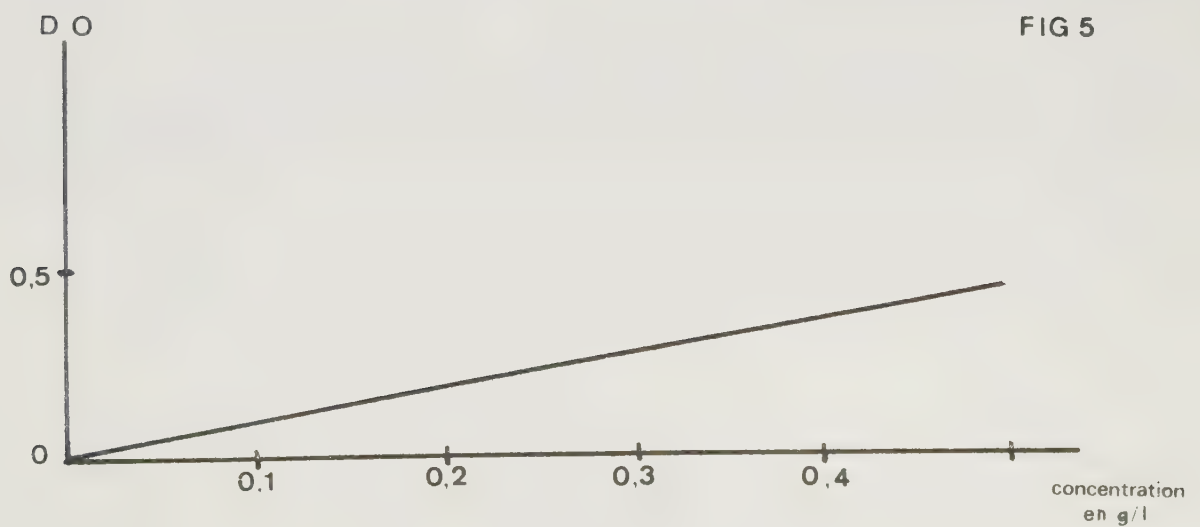
Les figures 4 et 5 donnent les droites d'étalonnage de chacun des colorants pour la sérum-albumine humaine.



Courbe d'étalonnage obtenue avec le naphtalène blue black
(sérum albumine humaine).



Courbe d'étalonnage obtenue avec le xylène-cyanin G
(sérum albumine humaine).



Nous avons insisté sur ces techniques de dosage des protéines à propos de l'électrophorèse en tubes de gel, car le domaine des protéines végétales est particulièrement délicat. LOOMIS et BATAILLE en 1965 (93) VAN LOON et VAN KAMMEN (132) en 1968 et ROUGE en 1971 (113) l'avaient déjà noté.

Nous verrons, avec l'étude des protéines foliaires et des protéines des graines, d'autres aspects de ces difficultés.

EN CONCLUSION

Même si des précautions sont prises pour les purifications préalables, pour la réalisation des gels et pour la standardisation des méthodes de dosage, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide présente plusieurs inconvénients :

- La durée de l'expérimentation ne peut être inférieure à 6 heures.
- Dans le meilleur cas une lecture directe ne permettra de définir qu'une dizaine de bandes protéiques. Il faut alors améliorer la définition par le Chromoscan.
- La sensibilité de cette méthode demande, ainsi que nous l'avons établi, une quantité moyenne de 2 grammes de protéines solubles par litre.
- Si la consistance des gels est relativement constante et la méthode reproductible, la manipulation de ces gels est difficile; en effet l'extraction des tubes porteurs avant la coloration s'avère délicate.

Ces faits nous ont conduit à envisager l'emploi de la plus récente des méthodes d'électrophorèse de zone : l'électrofocalisation.

2.5. Les Techniques d'Electro-Focalisation

La valeur de ces techniques d'électrofocalisation apparait dans le nombre de publications qui en font état; pour la seule année 1973 nous en notons environ 800. Initialement ces techniques devaient être employées à des fins analytiques, surtout après la mise au point des gels de polyacrylamide en couche mince. La plupart des domaines majeurs de la biochimie ont été explorés à l'aide des techniques de "focusing"; nous citerons :

- les Hormones : F.S.H., gonadotrophines, L.H., thyroïdostimuline
- les Immunoglobulines
- les Antigènes
- les Protéines sériques
- les Enzymes
- les Isoenzymes
- les Hémoglobines.

2.5.1. Notions théoriques sur l'électro-focalisation

L'électro-focalisation ou "focusing" peut être définie comme une électrophorèse dans un gradient de pH. Elle permet non seulement la séparation des molécules chargées mais encore leur concentration.

2.5.1.1. La migration dans un gradient de pH

Le principe général de l'électro-focalisation a été établi dès 1962 par SVENNSEN (126)* puis précisé par VESTERBERG de 1966 à 1973. (134) (135).

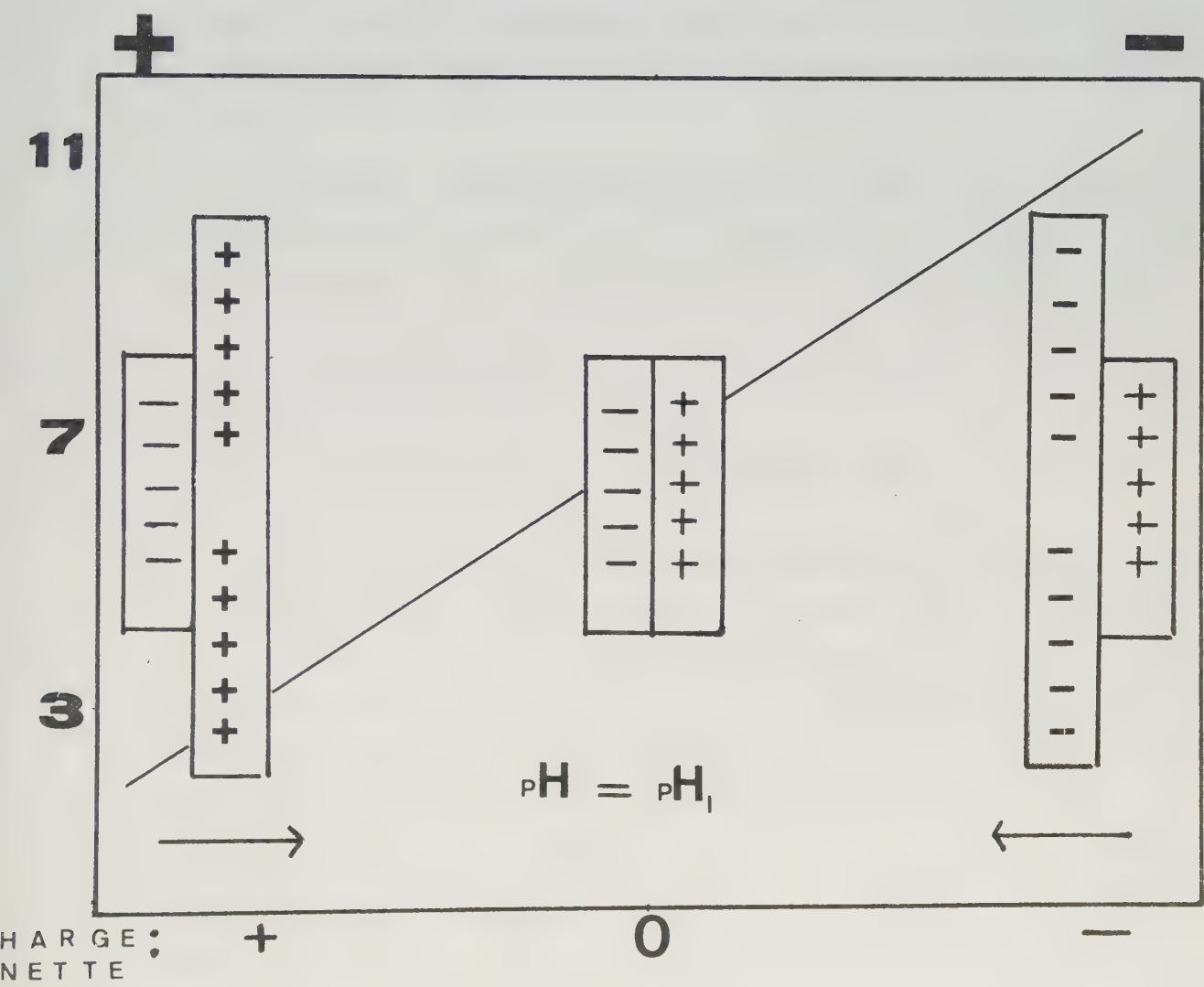
Principe : la charge nette d'une molécule ampholyte, protéine par exemple, dépend du pH du tampon de dissolution, Il existe une valeur de pH pour laquelle

*employant des peptides provenant de l'hydrolyse de l'hémoglobine.

Figure n° 6

Principe de l'électrofocalisation
=====

Les protéines sont représentées par des rectangles.



la charge nette de la molécule sera nulle. Ce pH définit alors le point iso-électrique ou pH_i de cette molécule, ainsi que le traduit la figure n° 6

S'il est possible de réaliser un gradient de pH aussi stable que possible, et s'il est linéaire, un champ électrique permettra non seulement une migration séparative de molécules ampholytes mais encore la concentration de chaque espèce moléculaire -("focusing")- lors de son immobilisation à son point iso-électrique.

Les groupes à charges positives -(essentiellement, pour une protéine, les fonctions amino et guanidino)- seront précisément positifs pour toutes les valeurs de pH inférieures à leur pH_i et migreront donc en direction de la cathode.

Les groupes à charge négative -(essentiellement, pour les protéines, les fonctions carboxyliques libres) seront négatifs pour toutes les valeurs de pH supérieures à leur pH_i et migreront donc en direction de l'anode.

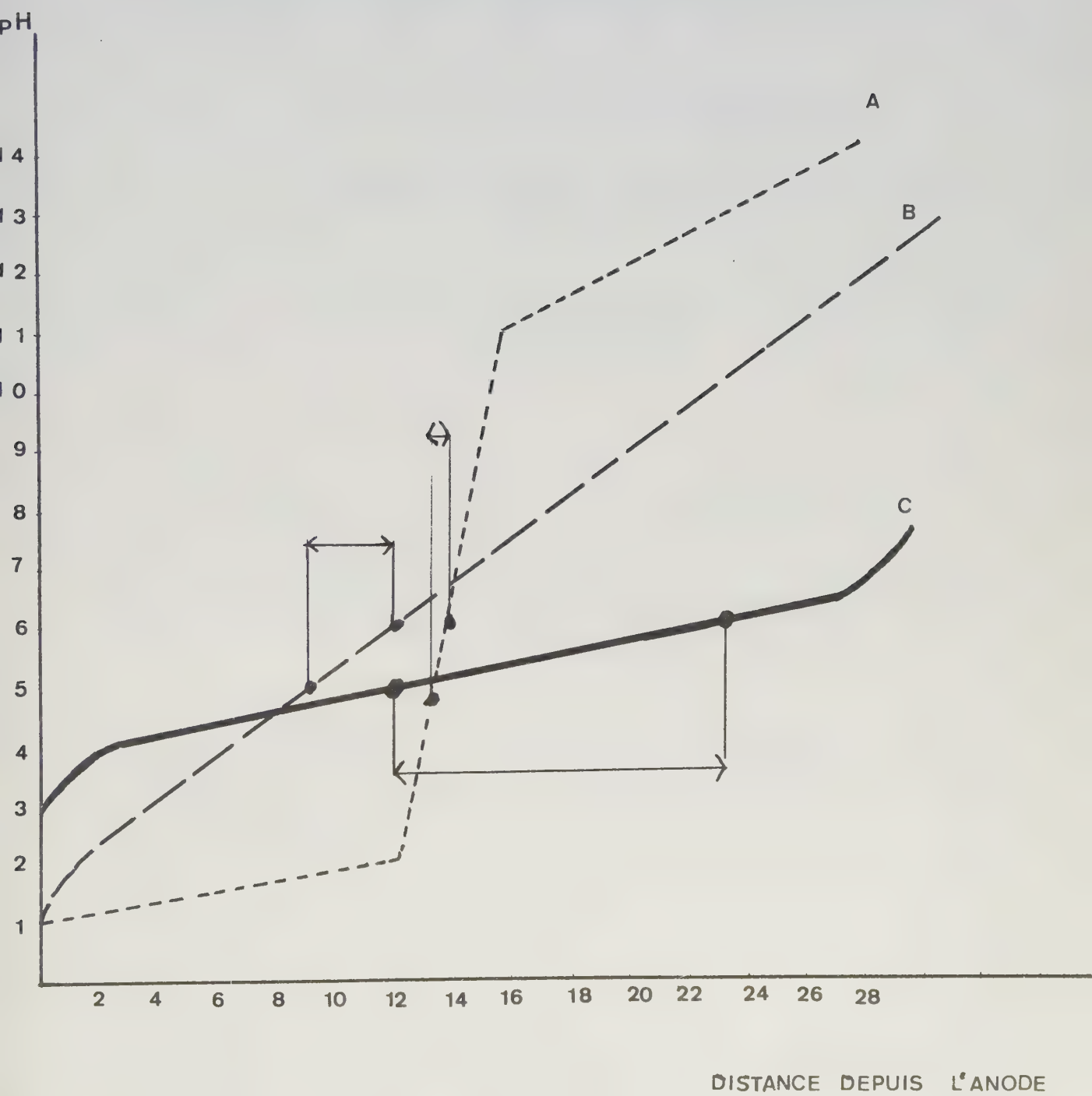
2.5.1.2 Le gradient de pH

Le gradient de pH est obtenu actuellement par des mélanges complexes; leur formule exacte n'est pas donnée par les laboratoires de fabrication et leurs dénominations dans la littérature sont souvent ambiguës. Les termes fréquemment rencontrés sont "carriers" ou "ampholytes transporteurs d'ampholines". Pour simplifier nous adopterons ici le terme "ampholines". Ce sont des mélanges d'acides aliphatiques poly-amino-poly-carboxyliques.

Au début de l'expérimentation, le pH de ces mélanges est constant, et sa valeur est la moyenne des valeurs de pH de chaque acide aliphatique constituant. Ensuite, sous l'action d'un champ électrique, des migrations se produisent en direction des électrodes : le gradient de pH se constitue, et chaque type moléculaire se focalise à son pH_i . Les plus faibles valeurs de pH sont anodiques, les plus élevées sont catodiques.

Figure n° 7

Séparation de deux protéines dans 3 types de gradients de pH



Ce qui est vrai d'un mélange d'ampholines le sera pour tout mélange protéique qui lui sera adjoint : chaque protéine sera transportée avec une ampholine, puis focalisée en même temps qu'elle à son pH_i .

La figure n° 7 illustre le pouvoir séparateur de la méthode :

Courbe (A) : gradient de sulfate disodique

Courbe (B) : gradient d'ampholines assurant la gamme de pH entre 3,5 et 10

Courbe (C) : gradient d'ampholines assurant la gamme de pH entre 3 et 6.

Nous voyons sur ces graphiques que le gradient de sulfate disodique ne permet pratiquement pas la séparation de deux protéines à leur pH_i , au contraire, les gradients d'ampholines permettent une séparation d'autant meilleure que la gamme de pH est moins large. Les deux protéines séparées avaient comme point isoélectrique respectivement 5 et 6.

C'est VESTERBERG (135) qui a mis au point la méthode de synthèse des ampholines à partir de polyamines polyéthyléniques en solution aqueuse et d'acide acrylique.

2.5.1.3 Propriétés des Ampholines

Les gammes de pH :

Nous disposons actuellement de solutions d'ampholines permettant la réalisation des 10 gradients usuels de pH :

- 3,5 à 10
- 2,5 à 4
- 3,5 à 5
- 4 à 6
- 5 à 7
- 5 à 8
- 6 à 8
- 7 à 9
- 8 à 9,5
- 9 à 11.

Les solutions sont en général à 40 % d'ampholines, sauf les gammes de pH 2,5 à 4 et 9 à 11, qui ont des concentrations de 20 %.

Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des ampholines ont été définies par VESTERBERG (135) et par DAVIES (30) . Leur poids moléculaire est compris entre 300 et 1.000.

En général les ampholines ne contractent pas de liaisons stables avec les protéines, ainsi que l'a montré FRATER en 1970 (56) . Elles assurent donc le gradient de pH sans risques de dénaturation pour ces dernières.

Cependant certains auteurs ont discuté ce risque. En 1976, PERCIVAL (109) puis FRATER (53) ont signalé des bandes aberrantes sur certains protéinogrammes. En 1973 POGACAR et JARECKI (110) ont même proposé le remplacement des ampholines de VESTERBERG par d'autres transporteurs.

Leur analogie fonctionnelle avec les protéines donne aux ampholines certaines propriétés voisines :

- réactions positives avec la ninhydrine ou le réactif de Folin
- possibilité de chélates avec les cations divalents.

2.5.1.4 Les supports de migration

La technique des ampholines utilise comme support de migration :

- la phase liquide dans des colonnes
- la couche mince de gel
- les gels en tubes spéciaux.

2.5.2 Techniques employées

Nous avons utilisé comme support soit la phase liquide en colonne soit la couche mince de gel. Certains expérimentateurs, tels que WRIGLEY (141, 142), RILEY et COLEMAN (112) ou FAWCETT (51) vers 1968 employaient les gels en tubes. Nous n'avons pas retenu cette méthode pour l'électrofocalisation, mais nous l'avons gardée comme technique d'électrophorèse traditionnelle, dans le but de comparer nos résultats avec ceux employant les ampholines en colonne ou sur couche mince de gel.

2.5.2.1 L'Electro-focalisation en colonne (figure n° 8)

Matériel utilisé :

L'électro-focalisation en phase liquide et en colonne a été standardisée par HAGLUND en 1967. (61) (62).

Nous avons employé une colonne LKB de 100 ml munie de son équipement LKB 8100 et d'un mélangeur à gradient LKB 8121 pour assurer un gradient de densité.

Le gradient de densité :

Il est obtenu à partir d'une solution dense faite avec 3/4 de solution d'ampholine et 1/4 de solution de saccharose pour le compartiment évacuateur

et d'une solution légère faite avec 1/4 de solution d'ampholine dans l'eau distillée pour le compartiment pourvu du cône répartiteur.

En effet, la méthode sur colonne demande certaines précautions en ce qui concerne les mouvements de convection. Nous les évitons en employant un gradient pratiquement linéaire de densité constitué par une solution non ionique comme le saccharose.

Conditions thermiques

La colonne est thermostatée à 4°C.

Réalisation de l'électrophorèse

Nous avons réalisé les électrophorèses en employant une anode en bas de colonne (avec solution sulfurique) et une catode en haut de colonne (avec solution sodique).

- 1 - Voltage : le voltage de départ a été fixé à 500 V pour une puissance de l'ordre de 3 W.
- 2 - Temps : selon les expériences, la durée de passage du courant a été de 10 à 15 heures. Ces valeurs sont plus faibles que celles de la littérature. De nombreux essais nous ont convaincu qu'au delà de ces temps, les risques de floculation ne sont pas négligeables. Les temps

Figure n° 8

ELECTROFOCALISATION SUR COLONNE (d'après un document L K B)

de passage sont d'autant plus courts que la gamme de pH est plus étendue; or nous avons travaillé habituellement avec la gamme large de 3,5 à 10. Enfin, le critère le plus simple pour déterminer la durée de passage du courant est sans doute qu'en fin d'expérience, au moment où toutes les protéines ont été amenées à leur pHi, leur ensemble forme condensateur, et le courant ne passe plus.

Elution et dosage

Après élution par le bas de la colonne, les fractions séparées par un collecteur LKB Ultra Rac type 7000, sont détectées à 280 nm par un appareil UVICORD 11 8303 A. Les mesures de pH seront faites éventuellement avec un appareil Metrohm 83008.

2.5.2.2. L'Electro-focalisation en couche mince de gel (figure n° 9)

Nous avons utilisé l'appareil LKB Multiphor 2117 dans les conditions suivantes :

Solutions pour obtention du gel

On dispose de quatre solutions :

Solution A : solution d'acrylamide à 30 %-(TOXIQUE)- Il est indispensable de filtrer la solution sur filtre millipore.

Solution B : solution de N, N' méthylène bisacrylamide à 1 % -(TOXIQUE)
Cette solution est également filtrée sur filtre millipore.

Solution C : solution de Riboflavine à 0,004 %

Cette solution est supprimée si l'addition d'ampholine est effectuée après polymérisation du gel. Dans nos essais préliminaires, nous n'avons pas constaté de différences entre l'une ou l'autre technique; nous avons donc adopté pour toutes les expériences le maintien de la solution C et l'addition d'ampholines avant polymérisation.

Figure n° 9

ELECTROFOCALISATION SUR GEL EN COUCHE MINCE (d'après un document L K B)

Solution D : solution de persulfate d'ammonium à 1 %.

L'emploi de cette solution implique la présence dans les extraits à étudier d'un réducteur : mercaptoéthanol ou dithiothréitol s'opposant à l'effet oxydant du persulfate sur les protéines.

Les solutions A, B et C peuvent être conservées en glacière 15 jours et la solution D une semaine.

Préparation des solutions pour gels

Pour réaliser le gradient de pH allant de 3,5 à 10, nous avons mélangé :

solution A	10 ml
solution B	10 ml
solution de saccharose 20 %	36 ml
" d'ampholines 3,5-10	3 ml
solution C	0,4 ml
solution D	0,4 ml

La réalisation du gel ne présente pas de difficultés particulières si nous respectons les conditions suivantes :

- La solution d'ampholines sera prélevée avec une seringue stérile.
- Un dégazage sous vide, avant l'addition des solutions C et D évitera la présence de bulles dans la plaque de gel après polymérisation.
- Le remplacement du saccharose par du sorbitol dans les cas où nous devons réaliser une gamme de pH dépassant 10. En effet le saccharose acquiert une polarité vers ces pH élevés.

Le mélange d'ampholines de divers pH ne semble pas utile, (contrairement à certaines notices d'emploi) pour réaliser le gradient désiré. Nous n'avons trouvé aucune différence entre des gels faits avec 3 ml de solution d'ampholine pH 3,5 à 10 et des gels faits en accord avec les notices citées.

Le mélange sera coulé immédiatement entre les plaques de verre qui servent pour la polymérisation.

Polymérisation du gel

Nous avons employé comme plaque support du verre de 2 mm d'épaisseur (180 mm x 240 mm), les électrodes sont ainsi distantes d'environ 100 mm.

La polymérisation, après coulée du mélange est effectuée sous rampe U.V. à 20 cm de la plaque pendant 1 h. 30.

Conservation du gel

Elle est excellente en glacière, nous n'avons constaté des modifications du comportement à l'électrophorèse que pour des gels conservés au delà d'une semaine.

Solutions pour électrodes

L'appareil possède des électrodes de platine sous enveloppe plastique. Le contact avec le gel est assuré par des bandelettes de papier spécial imbibées de solutions conductrices :

- . acide phosphorique à 9,8 % pour la solution anodique
- . soude à 4 % pour la solution catodique.

L'emploi de ces solutions est limité à la gamme large : pH de 3,5 à 10.

Conditions thermiques

La plaque supportant le gel est thermostatée à 40°C.

Dépôt des prélèvements

Nous avons utilisé des rectangles de papier Whatman n° 3 MM mesurant 10 mm x 5 mm ou 20 mm x 10 mm.

Ces rectangles sont imbibés par nos prélèvements; le dépôt est au minimum de l'ordre de 5 microlitres, au maximum de l'ordre de 12 microlitres.

En général, il est utile de faire les dépôts en double, pour déterminer la concentration donnant les protéinogrammes les plus lisibles. Il est possible de superposer plusieurs rectangles imbibés sans inconvénient.

Electrophorèse (Figure n° 10)

Elle doit être commencée vers 210 V sous 80 mA et être conduite le plus régulièrement possible surtout pendant le premier quart d'heure de la migration. En fin d'expérience, le voltage est de 1080 V sous 28 mA .

Le gradient est formé en une heure; il est donc possible d'effectuer les dépôts après une heure de mise en tension. Nous avons cependant placé nos dépôts avant la mise en tension.

La durée de la migration sera déterminée comme pour la technique d'électrofocalisation sur colonne; en effet le critère de durée est celui de la stabilisation du courant au moment où les protéines focalisées fonctionnent comme condensateur. Pour la gamme large d'ampholines les temps usuels varient de 1 h.30 à 2 h.30.

Dès à présent nous noterons un avantage essentiel de cette méthode par rapport aux colonnes d'ampholines, il s'agit de la brièveté des opérations.

Coloration du gel

Le gel, une fois détaché de sa plaque par un filet d'eau, se manipule aisément. Il est fixé par immersion dans l'acide trichloracétique à 15 % pendant 30 minutes, puis coloré par le Bleu de Coomassie R 250 :

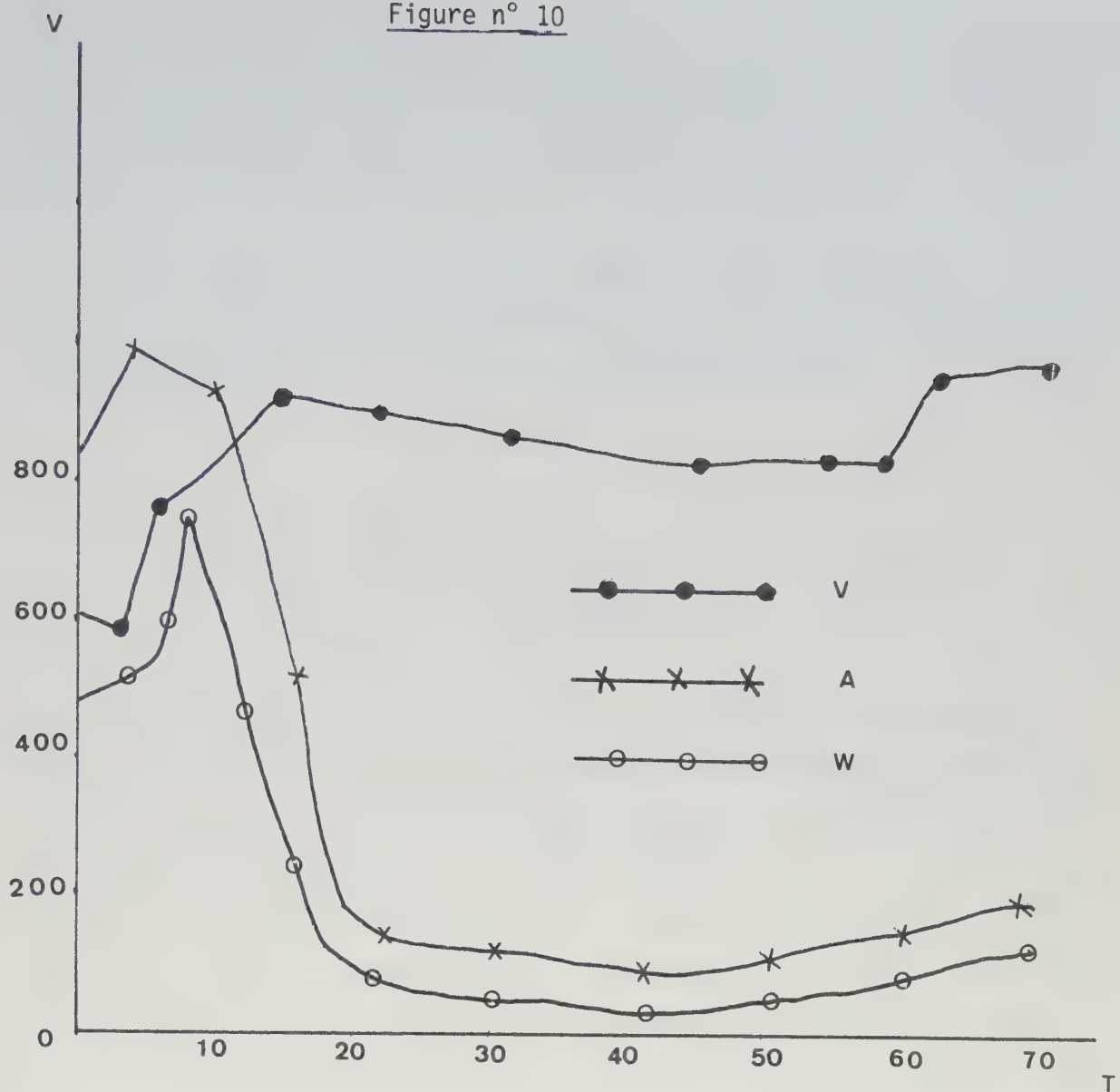
Bleu de Coomassie R 250	0,75 g
méthanol	225 ml
eau	465 ml
acide sulfosalicylique	22,5 g
acide trichloracétique	75 g

En général la coloration a lieu en étuve à 20°C pendant une trentaine de minutes. Pour les protéines végétales nous avons obtenu de meilleurs résultats, après une heure de contact.

Décoloration

Pour obtenir la décoloration du fond des protéinogrammes, le gel est placé dans un mélange : eau-alcool méthylique-acide acétique (8/3/1 v/v)

Figure n° 10



Variations de tension, d'intensité et de puissance pendant une électrofocalisation en couche mince de polyacrylamide.

(pH = 3 à 10. Distance des électrodes : 10 cm)

pendant une semaine. Ce temps est beaucoup plus long que celui préconisé par la plupart des auteurs; mais c'est le temps minimum pour obtenir des images nettes dans le cas des protéines végétales, même après des purifications préalables.

La présence de traînées peut rendre la lecture difficile. Elle est due soit à un effet de sels (la tolérance est de l'ordre de 20 micromoles par prélèvement), soit à la présence de polyphénols oxydés.

2.5.3 Problèmes posés par la présence des polyphénols

L'étude des tissus végétaux par les méthodes de focalisation est rendue difficile par la présence éventuelle de polyphénols. En effet, au moment du broyage des tissus en vue de l'extraction des protéines, ces dernières se trouvent au contact du contenu vacuolaire. Si des polyphénols sont présents, ils peuvent s'associer aux protéines par liaison hydrogène. De plus, les polyphénols risquent de se polymériser au moment de l'extraction et au moment de la focalisation. Ces polymères, associés aux protéines, provoquent sur les protéinogrammes des traînées qui masquent les bandes protéiques et rendent la lecture particulièrement délicate. Quand le phénomène a eu lieu, aucune technique complémentaire ne peut le supprimer. La prolongation des temps de décoloration après action du Bleu de Coomassie, toujours souhaitable pour une meilleure définition des bandes, s'avère tout à fait inutile.

Tous les auteurs ont signalé cette difficulté, en particulier VAN LOON et VAN KAMMEN (132) en 1958, puis P. ROUGE en 1971 (113).

Il faut donc empêcher la polymérisation et l'oxydation des phénols au moment même de l'extraction par une méthode rigoureusement standardisée.

. Cas de l'électrofocalisation sur colonne

L'extraction doit être réalisée dans un tampon Tris additionné d'un réducteur. Nous avons employé soit le 2 mercapto éthanol soit le dithiothréitol dans des conditions que nous précisons dans les chapitres relatifs aux Gymnospermes et aux Angiospermes. De plus, une purification des extraits par chromatographie sur colonne de Séphadex contribue utilement à la qualité des résultats.

. Cas de l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide

Nous avons employé pour tous nos extraits végétaux le dithiothréitol. Cette opération est suivie d'une fixation des polyphénols éventuellement formés sur de la polyvinyl-pyrrolidone.

Dans ces conditions, la sensibilité de la méthode est excellente, elle est d'environ 0,1 à 1 mg de protéine par ml d'extrait.

CHAPITRE II

ETAT DES TRAVAUX CONCERNANT LES PROCARYOTES

Les recherches concernant la taxonomie des Procaryotes d'après leurs protéinogrammes sont relativement peu nombreuses.

Dans le domaine bactérien MOSES et WILD (106) ont comparé la composition en protéines solubles de cinq souches d'*Escherichia Coli*. Quatre d'entre elles dérivent de la souche la plus connue : la souche K 12. Malgré leur origine commune des différences ont été constatées. En effet quatre souches descendant de la souche K 12 sont relativement distinctes les unes des autres. En outre la composition du milieu de culture a une incidence sensible sur les résultats.

Cette influence du milieu prouve combien il faut rester prudent dans la définition d'un phénotype bactérien.

Le groupe des Cyanophycées a posé à la taxonomie traditionnelle des difficultés de tous ordres. Les algues bleues en raison de leur teneur élevée en protéines, représentent un matériel de choix pour les études électrophorétiques.

DERBYSHIRE et WHITTON (34) ont comparé les protéinogrammes de 14 espèces de Cyanophycées. Trois de ces espèces, difficilement séparables par les critères morphologiques classiques se distinguent entre elles et par rapport aux onze autres si nous envisageons la position de leurs bandes protéiques et la valeurs de leurs points isoélectriques.

CHAPITRE III

APPLICATION DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL ET DE
L'ELECTROFOCALISATION A LA SYSTEMATIQUE DES
PEZIZALES

1) TRAVAUX ANTERIEURS

=====

Une des premières applications de l'électrophorèse à l'étude de protéines d'origine fongique a été la séparation des protéines solubles de *Neurospora* par CHANG et coll. en 1962 (20) ; il s'agit d'une recherche purement biochimique sans orientation systématique.

Par contre PEDUZZI et TURIAN en 1970 ont étudié le comportement de souches sauvages de *Neurospora crassa* par rapport à des souches mutantes ; ils ont constaté que les mutations se traduisent sur les protéinogrammes par l'apparition d'une à plusieurs bandes supplémentaires. En outre cette extension du spectre protéique, chez les mutants, est liée à une augmentation de la biosynthèse des constituants de la paroi cellulaire. (108)

L'électrophorèse sur gel d'amidon, a été utilisée par CLARE en 1963 pour réaliser les protéinogrammes de diverses espèces du genre *Pythium* (21)

L'année suivante cette même technique a permis à MEYER et coll. (101) d'étudier les estérases et les phosphatases contenues dans des filtrats de culture de *Fusarium oxysporum* et *Fusarium xylarioides*.

La méthode d'électrophorèse sur gel d'amidon permet également à CLARKE et ZENTMYER d'aborder la systématique de plusieurs *Phytophthora* (23)

En 1966 l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est employée par DURBIN (40) dans un travail consacré à divers *Septoria*.

L'année suivante NEALSON (107) compare avec cette technique les phosphatases, estérases et leucine-aminopeptidases de divers *Aspergillus*, tandis que BENT (10) procède à des recherches analogues sur trois espèces de *Penicillium*. Ce dernier auteur constate des variations importantes sur les protéinogrammes en fonction des milieux employés pour les cultures mycéliennes.

Vers la même époque, nous signalerons un travail comparatif de SHECHTER et coll. (117) sur un groupe de Dermatophytes. Ces auteurs ont cultivé sur milieu de Sabouraud : *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum* et *Epidermophyton floccosum*. Ils ont utilisé l'électrophorèse sur gels de polyacrylamide, et ont obtenu pour chaque protéinogramme 8 à 15 fractions. Par comparaison des résultats ils ont noté de nombreuses fractions homologues d'une part entre *Microsporum gypseum* et *Microsporum canis*, d'autre part entre *Trichophyton mentagrophytes* et *Trichophyton tonsurans*. Quant à *Epidermophyton floccosum*, les protéinogrammes présentent un nombre important de bandes spécifiques. Ces résultats sont tout à fait en accord avec ceux de la systématique morphologique.

En 1968, CLARE, FLENTJE et ATKINSON (22) ont réalisé une étude d'ensemble en comparant les protéinogrammes de plusieurs Phycomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes, Deutéromycètes. C'est ainsi qu'ont été étudié :

Chez les Phycomycètes : 14 espèces du genre *Pythium*

Chez les Ascomycètes : 2 espèces de *Saccharomyces* et 2 espèces de *Schizosaccharomyces*

Chez les Basidiomycètes: *Rhizoctonia solani*

Chez les Deuteromycètes: 4 espèces de *Fusarium*.

Les différences interspécifiques s'avèrent parfaitement nettes. Par contre, les variations intra-spécifiques le sont beaucoup moins, même si les souches sont de localisation éloignée ou sont parasites d'hôtes différents.

En 1969, HALL (63) a pu distinguer par leurs protéinogrammes deux espèces de *Verticillium* : *Verticillium albo-atrum* et *Verticillium dahliae*

dont la distinction est malaisée par l'étude du mycélium ou des conidies. Ce travail a confirmé les résultats de WHITNEY et coll.(140) qui avaient comparé ces deux *Verticillium* avec *Fusarium oxysporum*.

C'est aussi une série de *Fusarium* : *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti* et *Fusarium scirpi* qui sont étudiés en 1970 par BIANCO et coll. (11) . Ces auteurs opèrent sur divers supports électrophorétiques : acétate de cellulose, amidon et gel de polyacrylamide. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec ce dernier support. L'âge des cultures n'aurait pas d'influence notable -ce qui est en désaccord avec le travail de BENT-. Les protéinogrammes de *Fusarium oxysporum* s'avèrent extrêmement proches.

2) DISCUSSION SUR LES TRAVAUX PRECEDENTS

=====

Ce bilan n'est pas exhaustif. Une revue plus détaillée des travaux publiés dans le domaine cryptogamique de 1962 à 1975 montrerait que certains auteurs manifestent bien des réserves sur l'emploi de l'électrophorèse en taxonomie.

Ainsi SHIPTON et FLEISCHMANN (120) ont étudié les protéinogrammes d'urédospores provenant de deux races de *Puccinia coronata* et *Puccinia avenae*. Ils constatent une identité parfaite alors que ces races présentent un pouvoir pathogène très différent.

Des réserves analogues ont été faites par MEYER et MARAITE à la même date, à propos de *Fusarium oxysporum* sp. *melonis* et de *Fusarium oxysporum* sp. *elaeidis*. (101) (102).

Dans ces deux cas la connaissance d'une des manifestations importantes du génotype : les protéines n'explique pas un caractère phénotypique essentiel.

Mais toute méthode, si fine soit-elle, a ses limites. Nous dirons donc que dans les conditions où les auteurs cités ont travaillé, les variations discrètes susceptibles d'exister au niveau des sous-espèces n'ont pas pu être décelées.

Enfin une dernière remarque se dégage de cette étude. Aucun des auteurs n'a utilisé la technique d'électro-focalisation pourtant largement employée à la même époque dans d'autres domaines. En effet si la méthode a été parfois appliquée sur du matériel fongique cela l'a été à des fins biochimiques et non taxonomiques. C'est le cas des travaux effectués sur les cellulases de *Chrysosporium*, les phénols oxydases de *Podospora Anserina* et les galactosidases d'*Aspergillus niger*.

3) RECHERCHES PERSONNELLES

=====

Nous avons appliqué à la systématique de quelques Pezizales les méthodes d'électrophorèse : soit sur gel, soit en focalisation sur colonne d'ampholine et sur couche mince de polyacrylamide.

3.1. Raisons du choix des Pézizales

Le grand nombre d'espèces du genre *Morchella* présente pour le systématicien des difficultés qui nous ont été signalées par le Professeur BERTHET.

Pour les distinguer BOUDIER (15) puis GRELET (59) ont attaché une grande importance à des caractères morphologiques externes comme le carpophore et dénombré ainsi une trentaine d'espèces. Mais les auteurs modernes, tels DENNIS (33) ou MOSER (105) pensent généralement qu'il n'y a dans le genre *Morchella* qu'un petit nombre d'espèces, très polymorphes.

3.2. Position systématique des Pézizales

Les Pézizales sont des Discomycètes operculés. D'après les caractéristiques de leur carpophore nous pouvons distinguer selon MOREAU (104) la famille des Pézizacées et la famille des Helvellacées.

- Chez les Pézizacées les fructifications constituent le plus souvent des coupes épigées, plus ou moins stipitées. Parfois cependant elles forment des masses sphériques hypogées.

- Chez les Helvellacées la surface hyméniale présente un accroissement accusé. Les carpophores auront des aspects variés. Nous retiendrons dans cette famille les genres *Verpa* et *Morchella* :

- Dans le genre *Verpa* le chapeau forme des replis réguliers et coiffe le pied à la manière d'un coprin.

- Dans le genre *Morchella*, les plis de la tête fertile sont mieux marqués. Au sommet du pied se développe des crêtes longitudinales coupées d'arêtes transversales qui peuvent dessiner un réseau saillant, dont les trabécules stériles délimitent des alvéoles que tapisse l'hyménium.

Une autre classification a été proposée par BOUDIER (15) puis modifiée par Madame LE GALL . BOUDIER attachait une grande importance à la morphologie externe des appareils fructifères. Ces auteurs distinguent chez les Discomycètes operculés cinq familles : les Morchellacées, les Helvellacées, les Aleuriacées, les Humariacées, les Ascobolacées. Nous retiendrons que dans les Morchellacées ces auteurs font figurer les genres *Morchella*, *Verpa* et même *Disciotis* (*Disciotis venosa*) dont les caractères botaniques sont analogues mais dont le pied est beaucoup plus court. Ces mêmes auteurs regroupent notamment dans la famille des Helvellacées les genres *Helvella* et *Acetabula*.

3.3. Les espèces étudiées et leur provenance

Selon la classification donnée dans l'ouvrage de MOREAU (104) nous avons étudié une Pezizacée : *Disciotis venosa* et cinq Helvellacées appartenant au genre *Verpa* : *Verpa digitaliformis* et *Morchella* : *Morchella esculenta*, *Morchella hortensis*, *Morchella intermedia* et une morille de morphologie imprécise : *Morchella* sp. La plupart de ces champignons ont été récoltés dans la région lyonnaise. Ils ont été déterminés par le Professeur BERTHET.

Pour BOUDIER (15) au contraire toutes les espèces que nous avons étudiées appartiennent à la famille des Morchellacées.

- *Disciotis venosa* Pers. Boud. (souche 129). Possède un réceptacle charnu en forme de coupe dont la marge incurvée devient par la suite ondulée ou lobée. Ce réceptacle est blanchâtre sur sa face externe, brun-marron et plissé sur sa face interne. Le pied, très court, a des côtes saillantes blanchâtres. Cette espèce a été récoltée au printemps dans les bois de la région lyonnaise.

- *Verpa digitaliformis* Pers. ex Fr. (souche n° 627). Les champignons étudiés mesurent environ 10 centimètres. Le chapeau en forme de tronc de cône est inséré au sommet du pied, il est retombant et libre. Il présente une surface ridée de teinte brunâtre en dessus, blanche en dessous. Le pied mesure environ 6 centimètres; il s'atténue légèrement vers le haut, mais sa base est épaissie. Il est creux, possède une teinte ocracée et il est moucheté de petites écailles concentriques plus foncées formant des anneaux transversaux. Ce champignon peu commun se rencontre au printemps dans les haies et les bois.

- *Morchella hortensis* Boud. (souche n° 536). Les exemplaires étudiés ont été récoltés sur des débris de bois dans le Var. Ils mesurent en moyenne

25 centimètres de haut. Le chapeau ovoïde, présente des alvéoles de petite taille. Sa couleur varie du brun pâle à l'ocracé (Munsell 10 YR 7/4 à 7/6). Ses côtes longitudinales noircissent avec l'âge et émettent des appendices transversaux incomplets. L'espace situé entre le bord inférieur du chapeau et le pied est très réduit. Le pied finement villositéux est plus clair que le chapeau. Au sommet il a un diamètre inférieur du quart ou du tiers à celui du chapeau. (photo n° 1)

- *Morchella intermedia* Boud. (souche n° 330). Ces champignons récoltés dans la région lyonnaise mesurent en moyenne 15 centimètres. Le chapeau ovoïde est brun pâle. Il présente des côtes stériles bien marquées. Il est ainsi aisé de la différencier de *Morchella hortensis* Boud. et ce malgré un habitat rudéral commun. L'espace entre le bord inférieur du chapeau et le pied est très réduit. Le diamètre du sommet du pied est inférieur de moitié à celui du chapeau. (photo n° 2)

- *Morchella esculenta* Pers. ex Fr. synonyme : *Morchella vulgaris* Pers. ex Fr. (souche n° 130). Les champignons étudiés ont été récoltés à Millery (Drôme). Ils mesurent environ 15 centimètres de haut. Le chapeau ovoïde, possède des côtes longitudinales émettant de courts appendices transversaux inégaux, chez les espèces jeunes. Chez l'adulte son aspect alvéolé, évoque une éponge. Sa couleur est brun fauve. Il n'y a pas d'espace libre entre le bord inférieur du chapeau et le pied. Ce dernier irrégulièrement cylindrique est sillonné surtout à la base. Sa teinte est ocracée.

- *Morchella* sp. (souche n° 915). Les échantillons récoltés dans la région lyonnaise mesurent en moyenne 10 centimètres. Ils possèdent un chapeau arrondi, de teinte brun olivâtre, des crêtes stériles grossièrement parallèles et en partie anastomosées. L'espace entre le bord inférieur du chapeau et le pied est très réduit. Le pied a un diamètre deux fois plus faible que celui du chapeau; il est de teinte faiblement ocracée. L'allure générale de ce champignon évoque celle de *Morchella hortensis*. (photo n° 3)

Photo n° 1

Morchella hortensis (souche n° 536)

Photo n° 2

Morchella intermedia (souche n° 330)

Photo n° 3

Morchella sp. (souche n° 915)

3.4. Obtention des myceliums

Après quelques essais, nous avons choisi le maltea à 2 %, comme milieu de culture.

Pour obtenir des quantités relativement importantes de mycélium, nous avons procédé à un ensemencement préalable, en chambre stérile, dans des erlens de 250 ml.

Au bout d'une semaine, le mycélium prélevé est broyé sommairement puis ensemencé en ballons de 5 litres contenant 1 litre de maltea à 2 pour cent. Nous avons travaillé par série de 6 ballons; chaque souche figure en double en cas de contamination. Ces cultures reçoivent une circulation d'air réglée à un débit lent. L'air sortant passe sur une solution de sulfate de cuivre à 5 pour cent.

Un examen microscopique nous permet de contrôler l'absence de contamination par spores ou par bactéries.

Dans de telles conditions, le développement mycélien est rapide. En effet, le prélèvement final a été effectué au bout de 10 jours pour les différentes souches étudiées.

Chaque prélèvement est lavé en chambre stérile, essoré puis conservé en sacs plastiques au congélateur si l'analyse n'est pas immédiate.

3.5. Préparation des extraits de mycélium :

Après un broyage sommaire 20 g de mycélium frais sont traités au Soxhlet par l'éther de pétrole. Cette opération dure 36 heures et permet l'élimination des lipides.

Le mycélium est repris par 10 ml du tampon suivant :

Solution de TRIS chlorhydrique	0,05 M - pH = 7,8
Saccharose	0,4 M
Chlorure de magnésium	0,002 M
Chlorure de calcium	0,002 M
Mercaptoéthanol	0,004 M

Deux broyages successifs sont ensuite effectués dans ce tampon : l'un à l'aide d'un Warring Blender, l'autre au mortier en présence de sable de Fontainebleau. Nous avons vérifié au microscope que ce second broyage est indispensable pour détruire les structures cellulaires.

Nous procédons ensuite à une filtration sur gaze. Le filtrat est centrifugé à 10.500 G pendant trente minutes, puis à 100.000 G pendant une heure en centrifugeuse réfrigérée. Nous avons pu vérifier que ces deux centrifugations successives ont une influence sur la qualité des protéinogrammes. Par contre, une purification sur colonne de Sephadex n'est pas indispensable car les migrations électrophorétiques ultérieures ne sont pas perturbées par des pigments ou par des polyphénols.

Le surnageant est ensuite concentré sur membrane Diaflo dans des cellules de 50 ml. Nous opérons sous pression d'azote.

Les extraits concentrés peuvent être conservés au congélateur. En fait, il est préférable de les passer le plus rapidement possible à l'électrophorèse.

Trois méthodes ont été utilisées :

- . électrophorèse sur gel de polyacrylamide
- . électrofocalisation sur colonne d'ampholines
- . électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide.

3.6. Réalisation des gels de polyacrylamide pour Electrophorèse simple

Nous avons employé des gammes de 12 tubes passés intérieurement au column coat, puis réalisé l'électrophorèse conformément à la méthode que nous avons exposé dans les techniques générales.

3.7. Emploi de l'électro-focalisation sur colonne d'ampholines

Nous avons appliqué également la technique d'électrofocalisation sur colonne d'ampholines décrite dans les techniques générales. Le gradient de pH allait de pH 3 à pH 10.

3.8. Emploi de l'électro-focalisation sur couche mince

Nous avons utilisé l'appareil Multiphor selon la technique décrite antérieurement. Le gradient de pH allait également de pH 3 à pH 10.

3.9 Résultats obtenus

3.9.1 Comparaison des trois méthodes d'électrophorèse

Nous avons comparé les résultats obtenus par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, focalisation sur colonne d'ampholines et électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide.

Les résultats obtenus ont été regroupés dans les tableaux suivants:

Nous avons affecté :

- des chiffres romains aux pics ou blocs obtenus par la focalisation sur colonne
- des lettres majuscules aux pics donnés par le Chromoscan à partir des gels d'électrophorèse simple

Tableau n° 1

Espèce et N° de souche	Nombre de bandes sur gel simple	Pics ou blocs en focalisation sur colonne	Bandes de focalisation en couche mince
<i>Morchella</i> sp. N° 915	A B C C' D E E'	I II III : bloc de 4 IV : bloc de 4 V VI VII	
Total	7	13	26
<i>Morchella hortensis</i> N° 536	A B C C' D - -	I II III : bloc de 2 IV : bloc de 3 V VI VII	
Total	5	10	24
<i>Morchella intermedia</i> N° 330	A B C C' D E E	I II : bloc de 5 III IV V : bloc de 5 VI : bloc de 3 VII	
Total	7	17	20
<i>Morchella esculenta</i> N° 130	A A' B C D E F G	I : bloc de 2 II III IV V VI : bloc de 4 VII VIII: bloc de 3	
	8	14	17

Tableau n° 2

Espèce et N° de souche	Nombre de bandes sur gel simple	Pics ou blocs en focalisation sur colonne	Bandes de focali- sation en couche mince
<i>Disciotis venosa</i> N° 129	A A' B C D D' E E' - -	I II III : bloc de 2 IV : bloc de 3 V VI VII : bloc de 3 VIII : bloc de 2 IX X	
Total	8	16	21
<i>Verpa digitaliformis</i> N° 627	A B B' - D - E	I II : bloc de 3 III : bloc de 2 IV V VI VII	
Total	5	13	20

Pour chaque espèce étudiée nous avons représenté graphiquement :

- Les enregistrements obtenus après passage des protéinogrammes sur le Chromoscan. Fig. n° 11, 14, 17, 20, 23, 26.
- Les diagrammes d'électrofocalisation sur colonne d'ampholines. Fig. n° 12, 15, 18, 21, 24, 27.
- Les protéinogrammes d'électrofocalisation sur couche mince en polyacrylamide. Fig. n° 13, 16, 19, 22, 25, 28.

M O R C H E L L A H O R T E N S I S

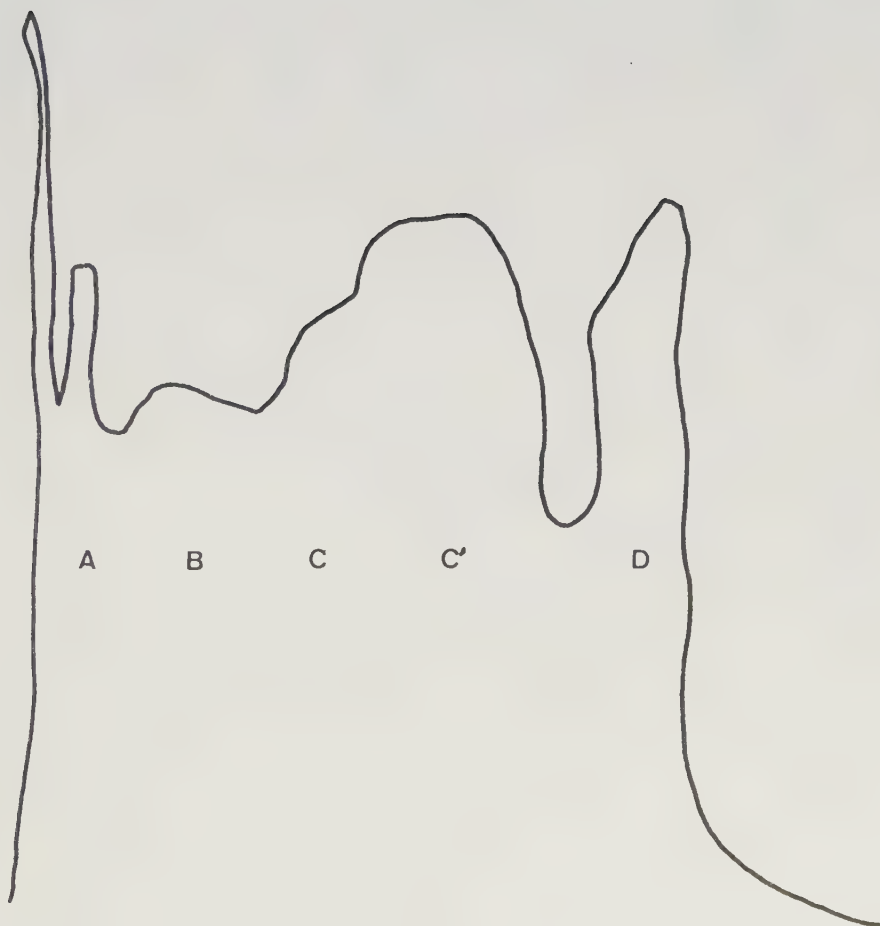
(536)

Figure n° 11

MORCHELLA

HORTENSIS

5 3 6



Enregistrement obtenu après passage du protéinogramme.
sur Chromoscan.

Figure n° 12

MORCHELLA HORTENSIS 5 3 6

Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

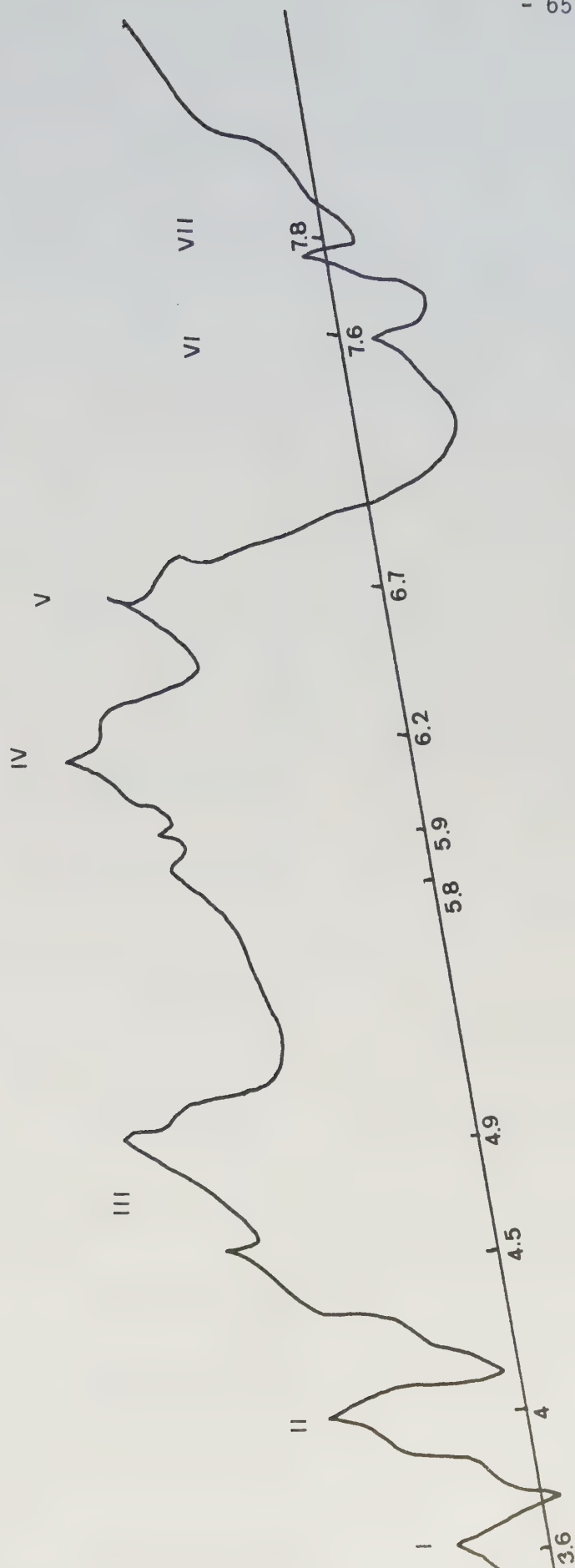
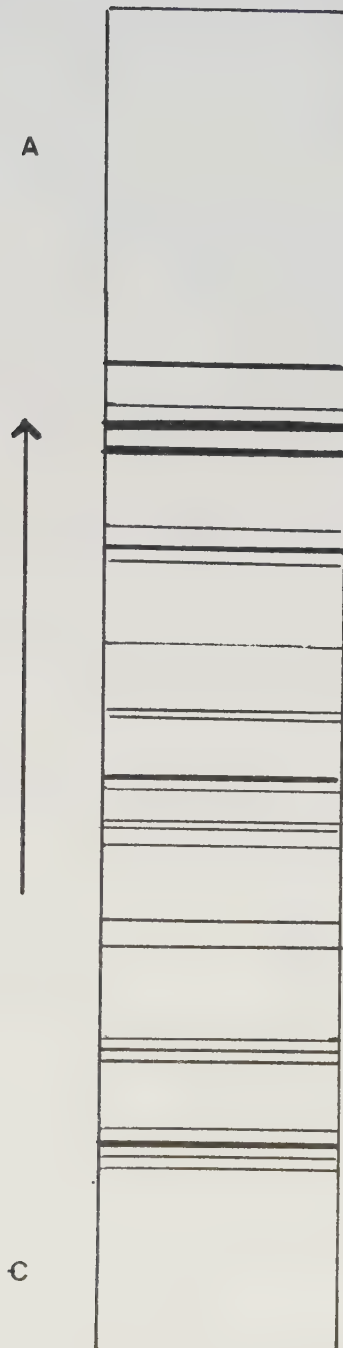


Figure n° 13

Morchella hortensis

Protéinogramme

5 3 6

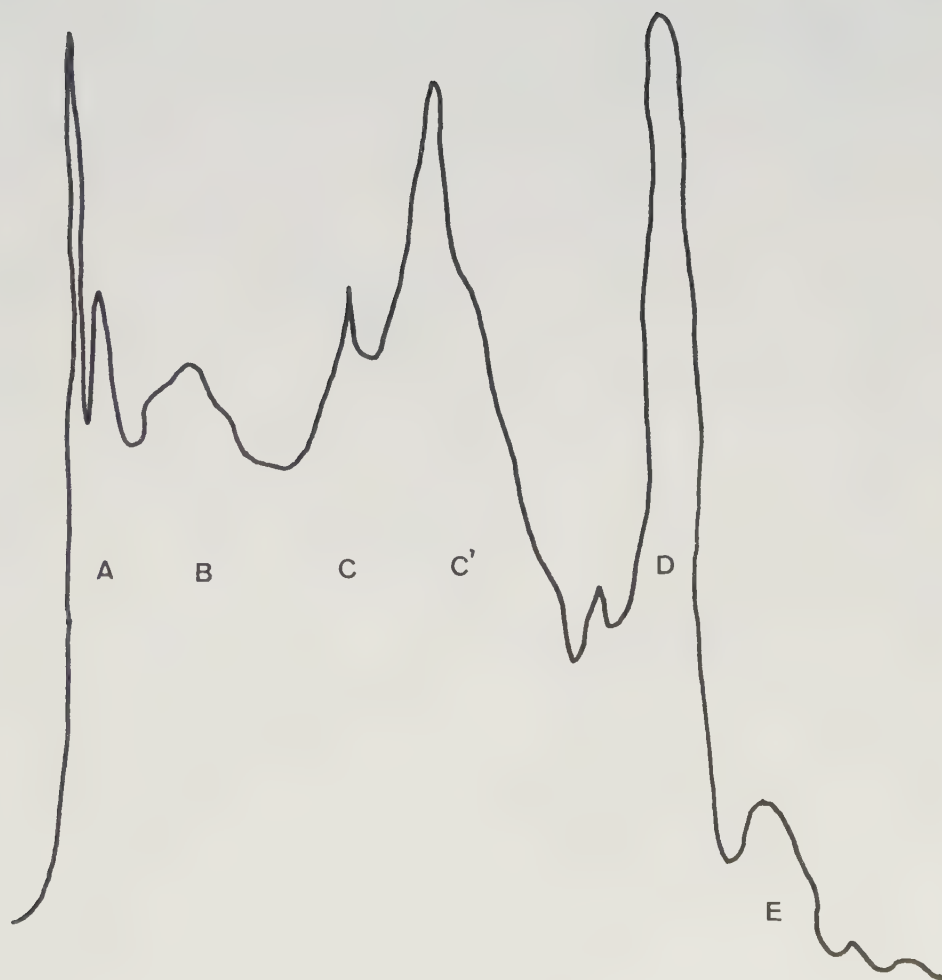


M O R C H E L L A sp.

(915)

Figure n° 14

MORCHELLA SP. 9 1 5



Enregistrement obtenu après passage du protéinogramme
sur le Chromoscan.

Figure n° 15 Diagramme d'électrofocalisation sur colonne.

MORCHELLA SP.

915

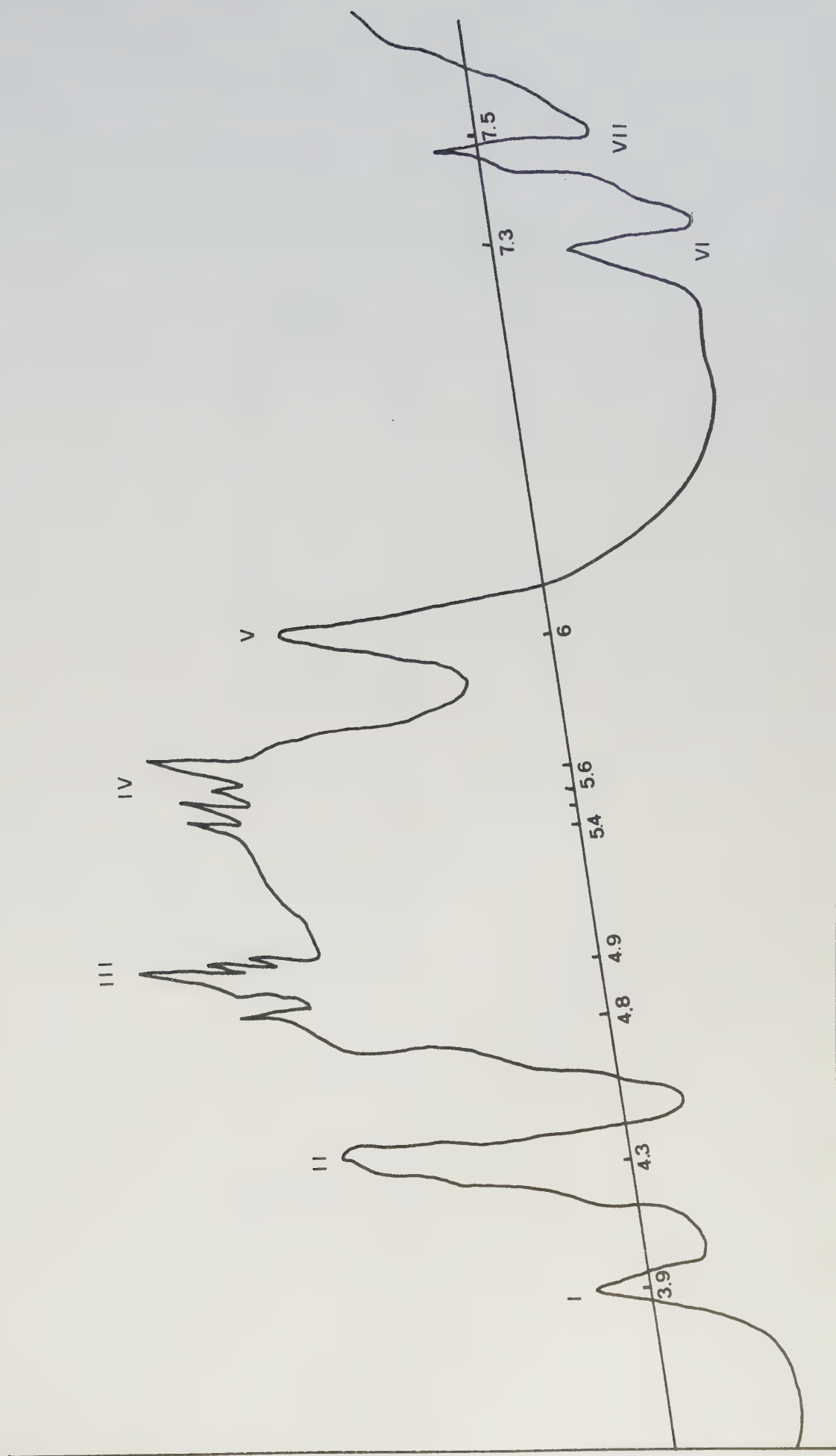
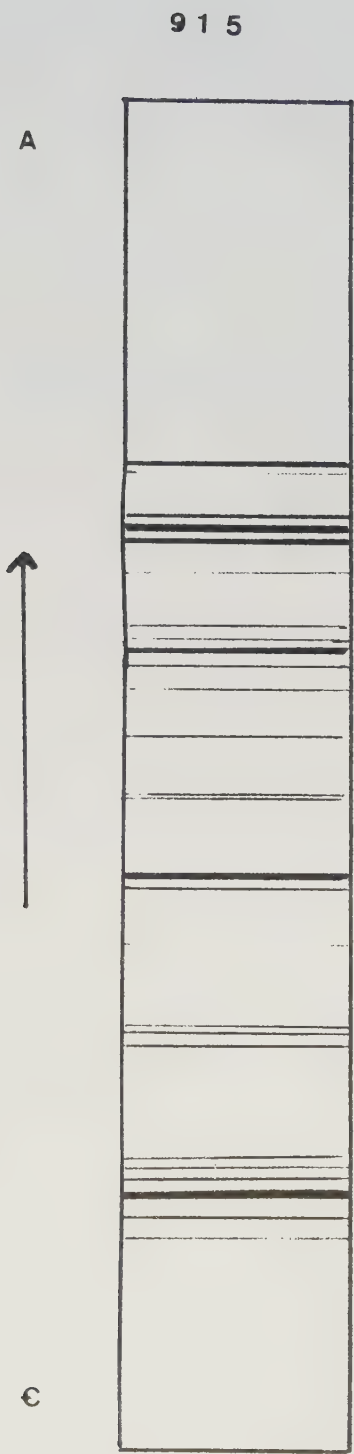


Figure n° 16 Protéinogramme

Morchella sp.

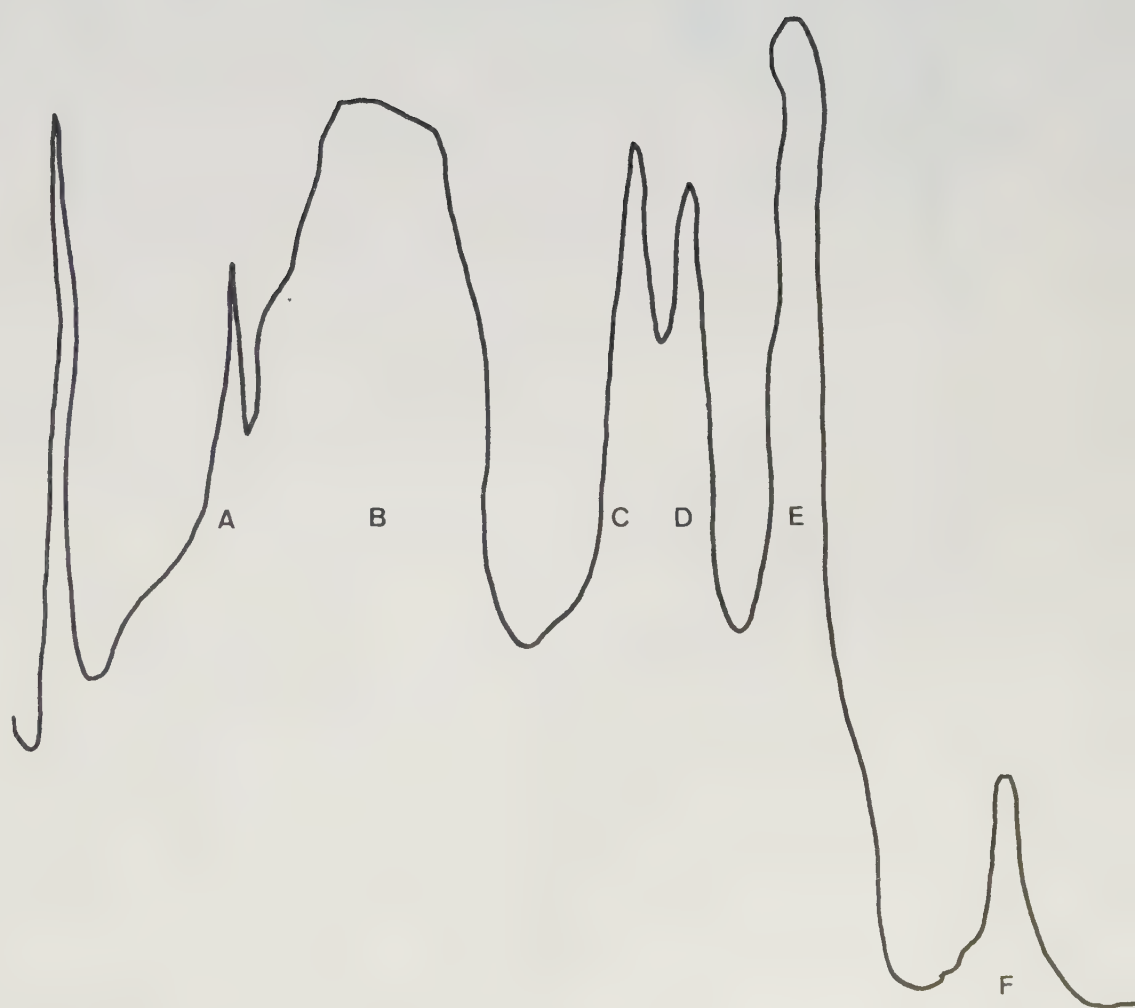


M O R C H E L L A I N T E R M E D I A

(330)

Figure n° 17

MORCHELLA INTERMEDIA 330



Enregistrement obtenu après passage sur
protéinogramme sur le Chromoscan.

Figure n° 18

MORCHELLA

INTERMEDIA

(3 3 0)

Diagramme d'électrofocalisation sur colonne.

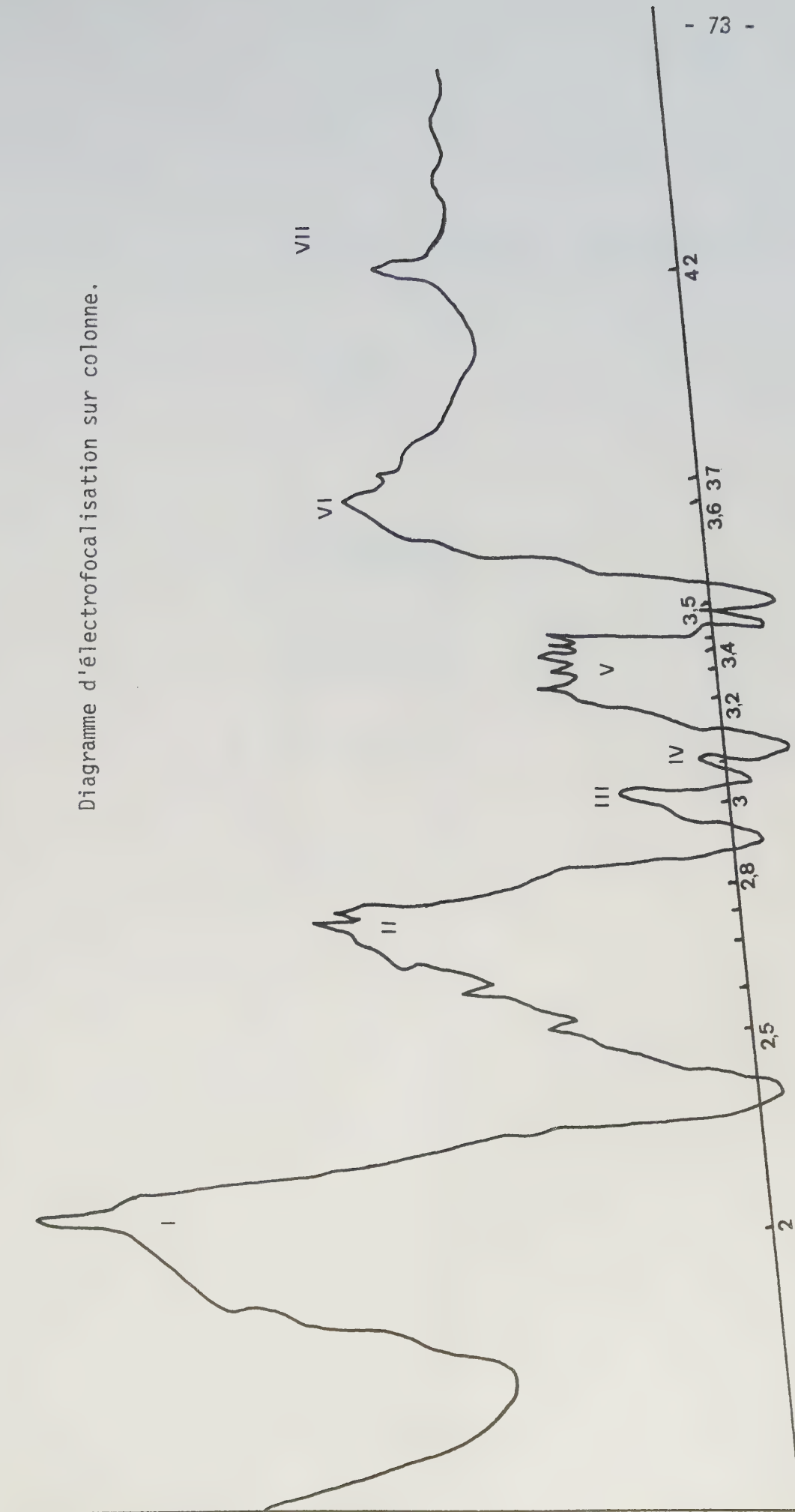
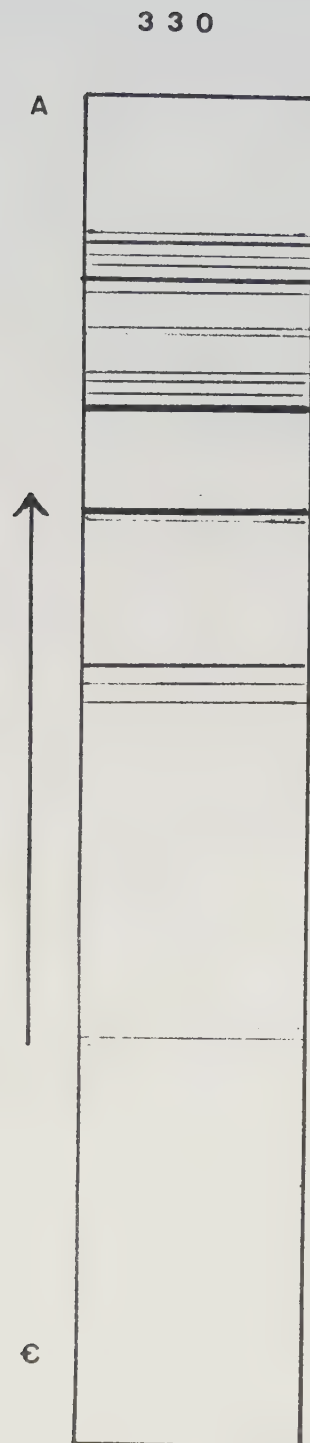


Figure n° 19

Morchella intermedia protéinogramme



M O R C H E L L A E S C U L E N T A

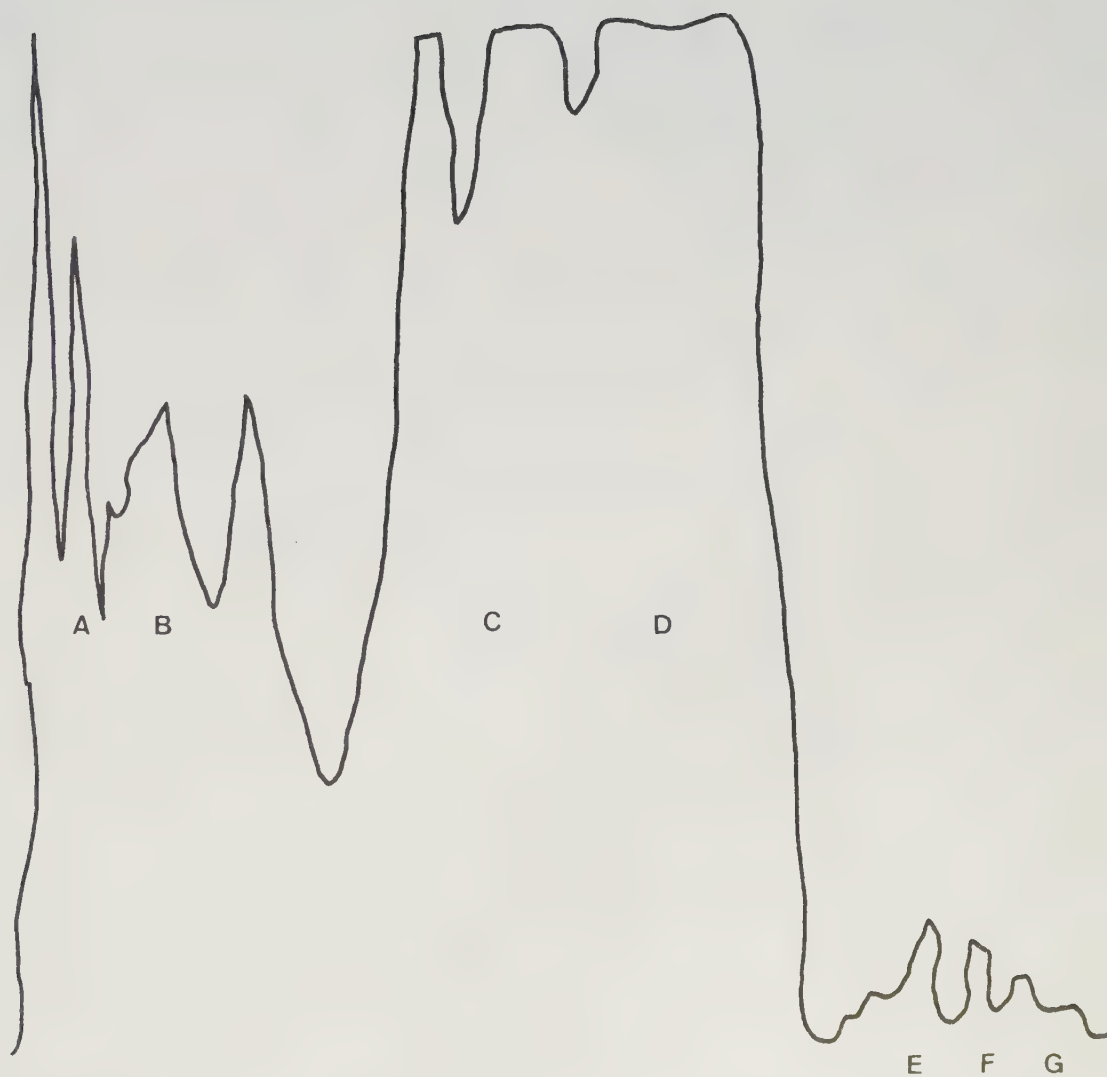
(130)

Figure n° 20

MORCHELLA

ESCULENTA

1 3 0



Enregistrement obtenu après passage du protéinogramme
sur le Chromoscan.

Figure n° 21

MORCHELLA ESCULENTA 130

Diagramme d'électrofocalisation sur colonne.

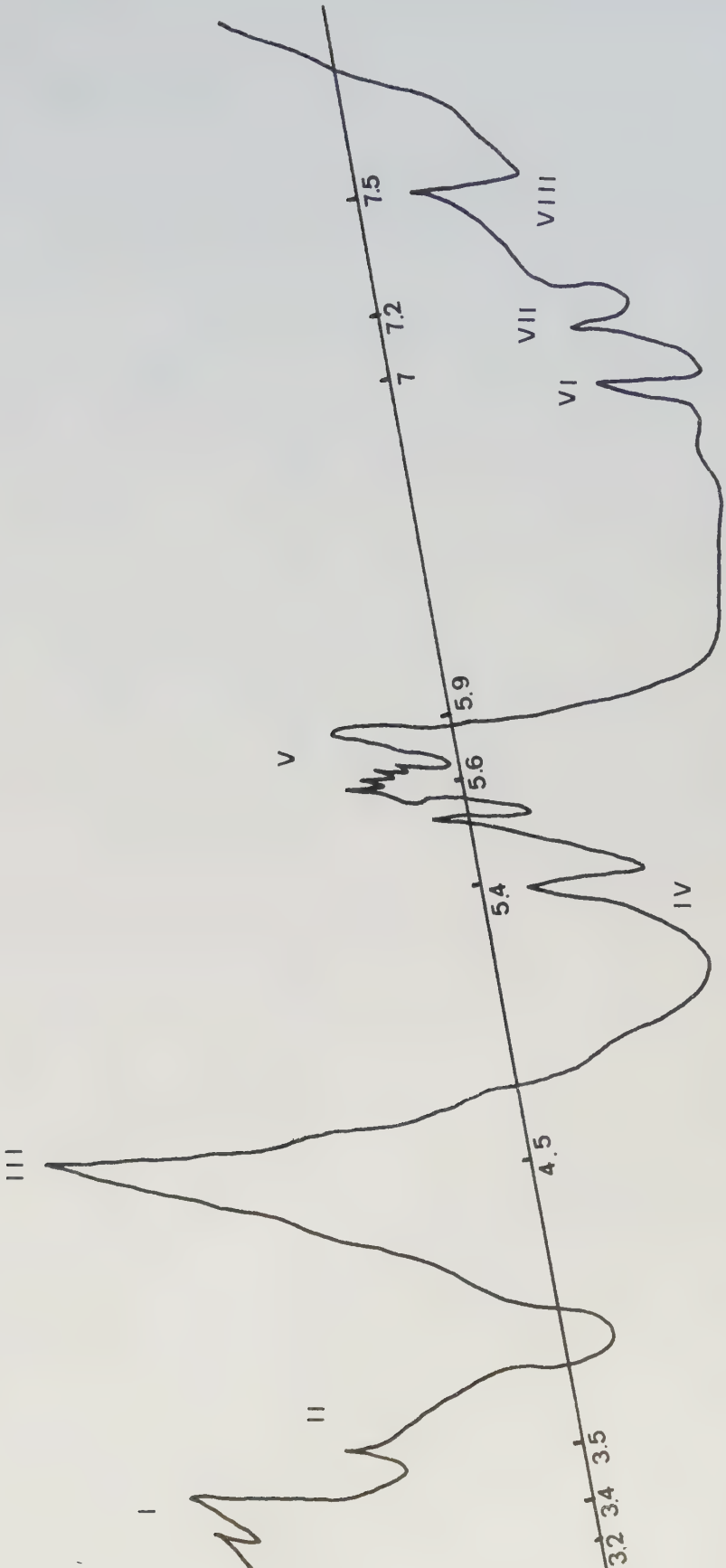
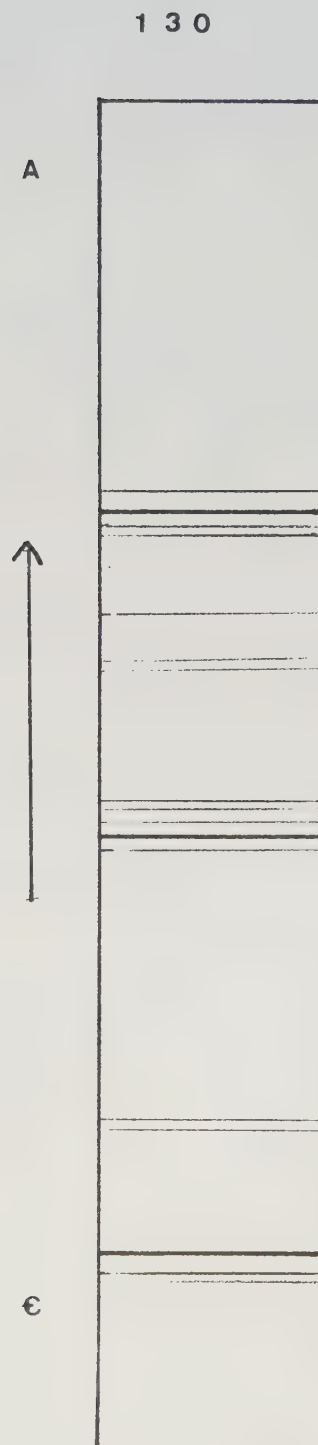


Figure n° 22

Morchella esculenta protéinogramme



D I S C I O T I S V E N O S A

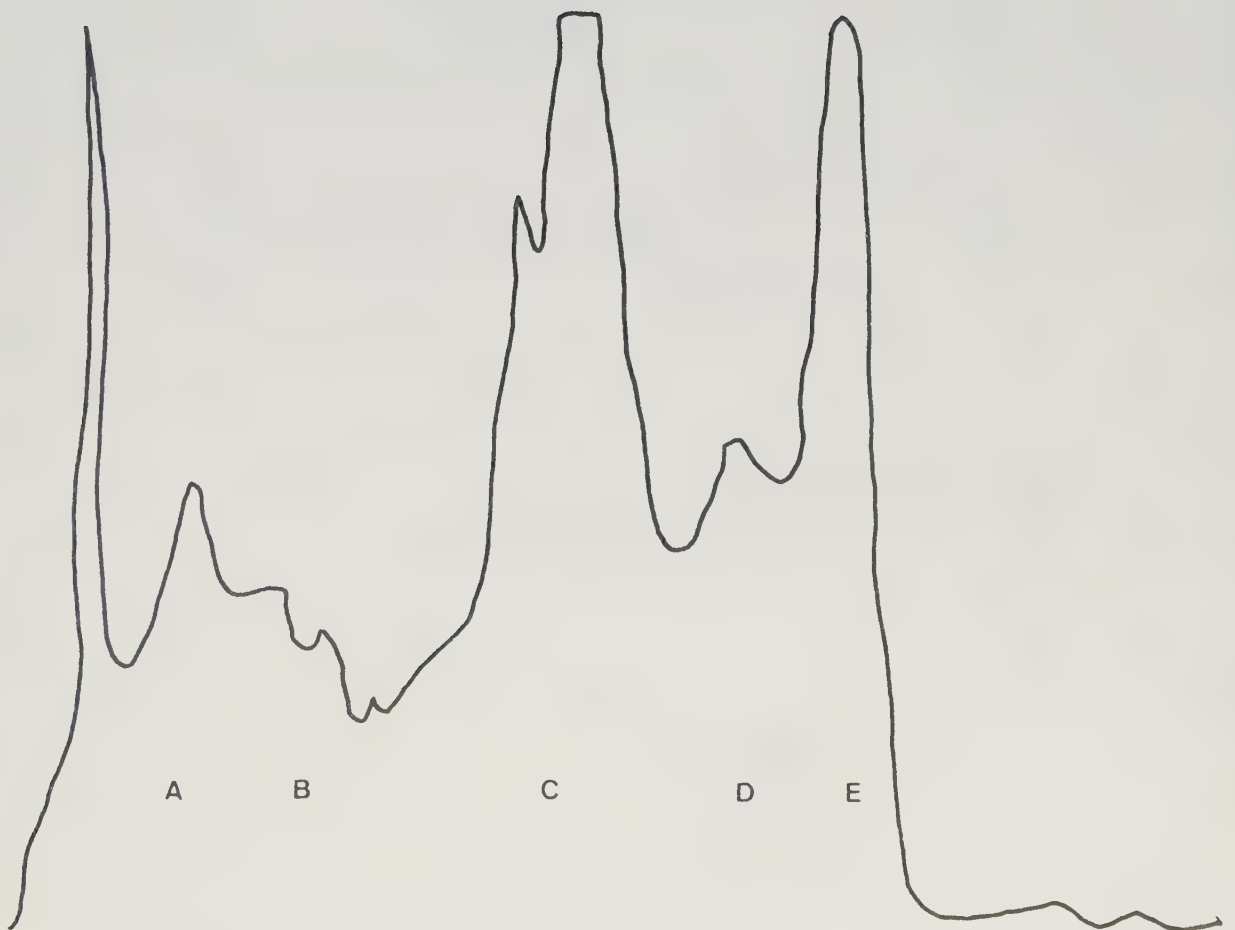
(129)

Figure n° 23

DISCIOTIS

VENOSA

1 2 9



Enregistrement obtenu après passage du protéinogramme
sur le Chromoscan.

DISCIOTIS VENOSA (1 2 9)

Diagramme d'électrofocalisation sur colonne.

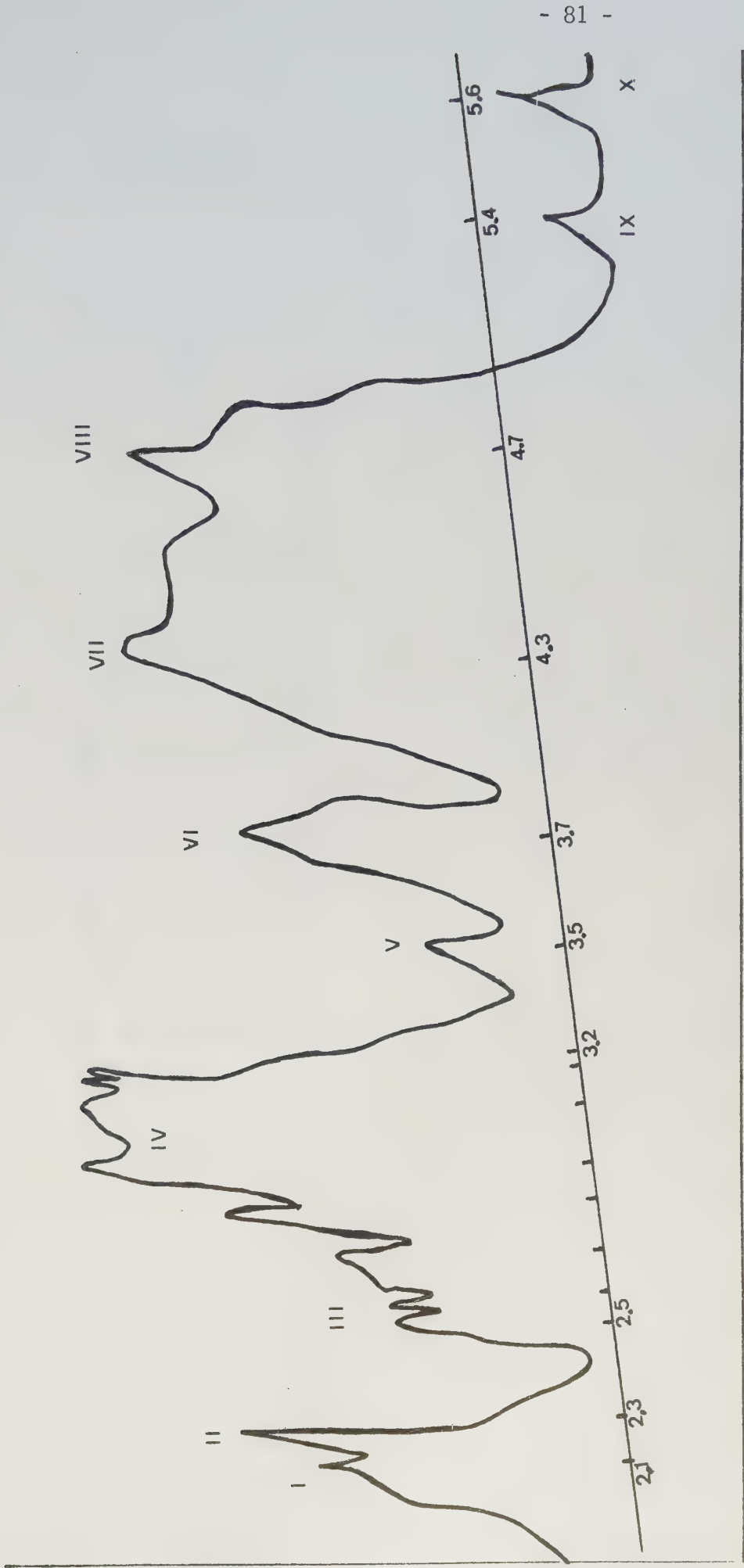
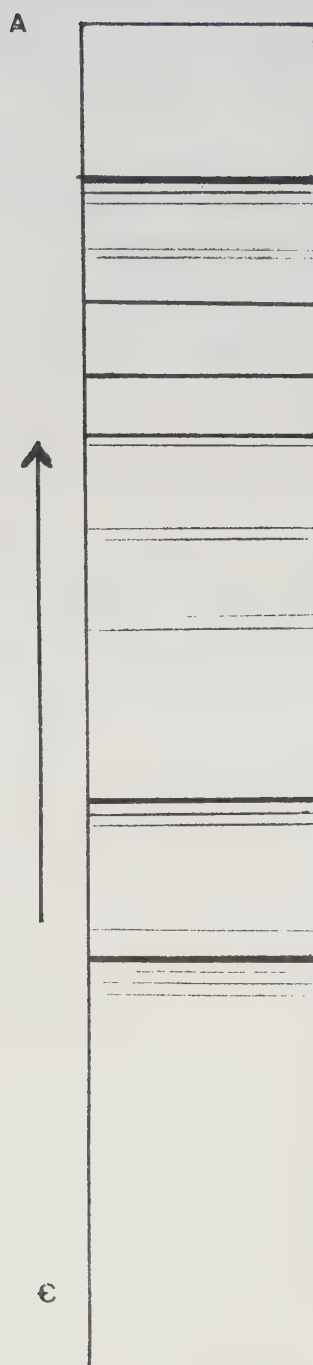


Figure n° 25

Disciotis venosa

protéinogramme

1 2 9

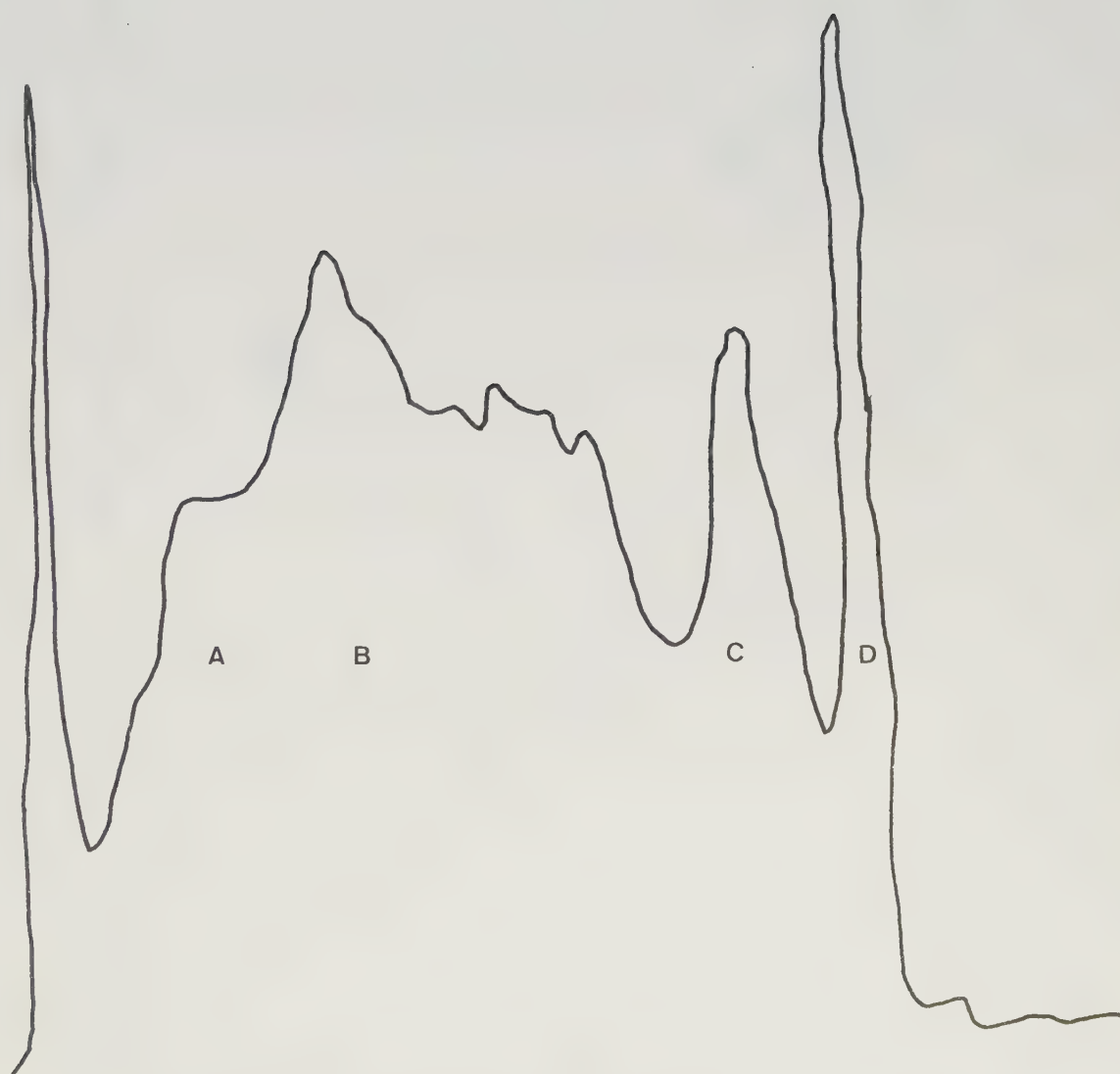


VERPA DIGITALIFORMIS

(627)

Figure n° 26

VERPA DIGITALIFORMIS 6 2 7



Enregistrement obtenu après passage du protéinogramme
sur le Chromoscan.

VERPA DIGITALIFORMIS 6 2 7

Diagramme d'électrofocalisation sur colonne.

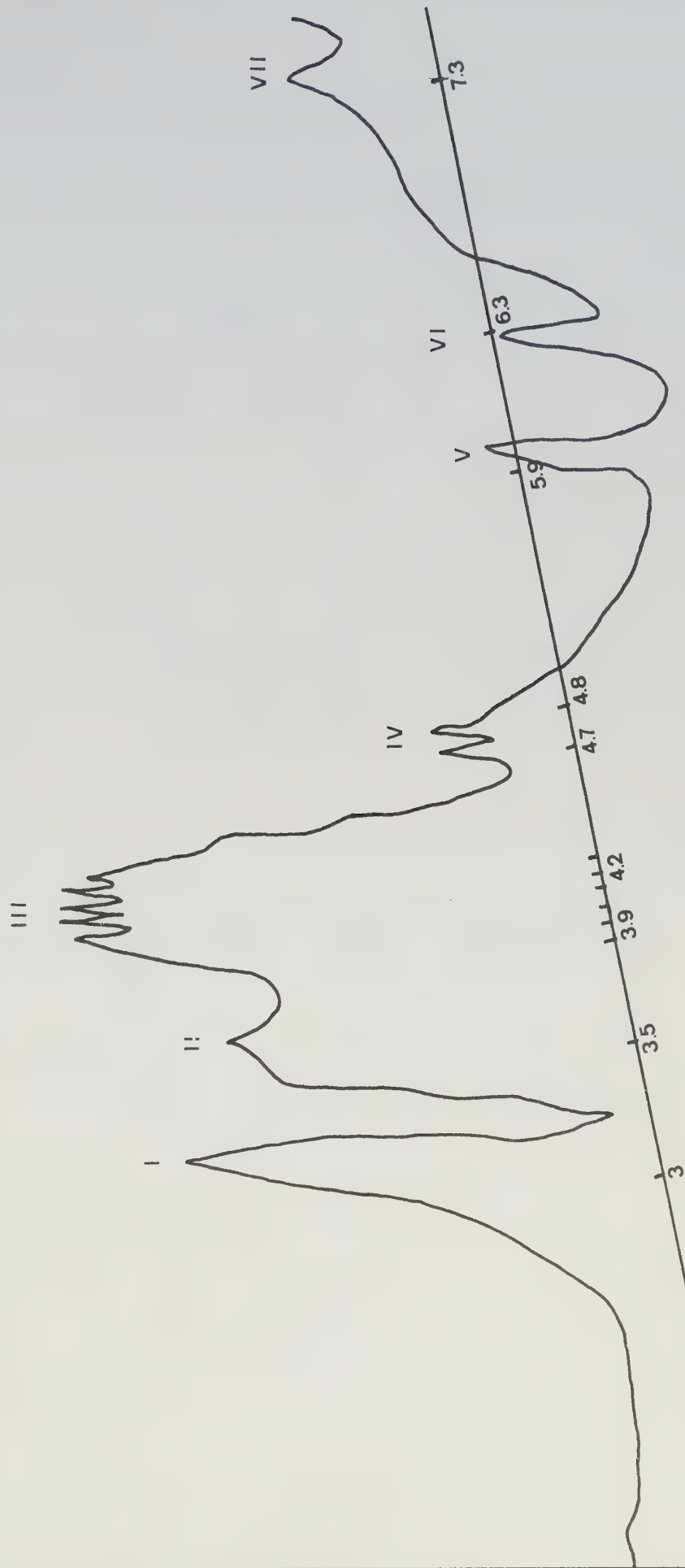
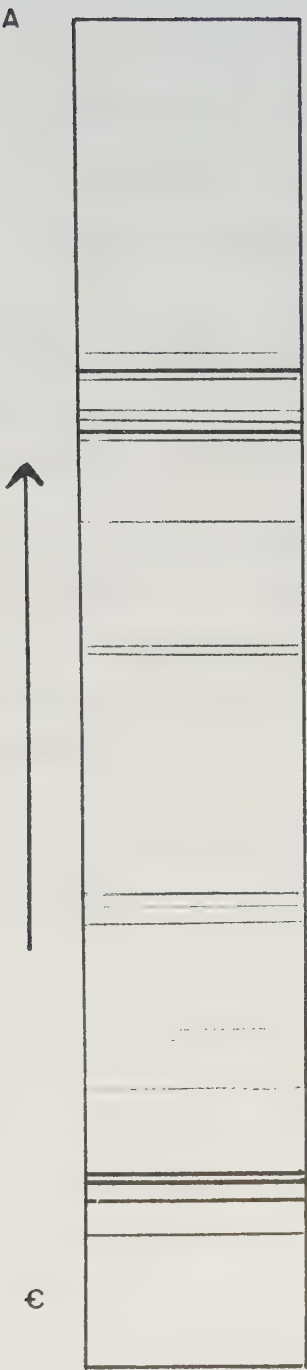


Figure n° 28

Verpa digitaliformis protéinogramme

6 2 7



L'électrophorèse simple sur gel de polyacrylamide, l'électro-focalisation sur colonne d'ampholines et l'électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide donnent des résultats comparables, mais, comme nous pouvions le prévoir, les deux techniques d'électro-focalisation aboutissent à une meilleure définition. Aussi nous les avons retenues pour l'étude de nos *Morchellacées*. Entre ces deux dernières techniques, celle sur couche mince de polyacrylamide fait apparaître un nombre plus élevé de bandes protéiques.

3.9.2. Comparaison de différentes espèces de Pézizales
étudiées par la technique d'électrofocalisation sur
colonne d'ampholines (Fig. n° 12,15, 18, 21, 24, 27)

3.9.2.1. Comparaison entre les quatre souches de *Morchella*

- a) *Morchella* sp. (souche n° 915)
Morchella hortensis (souche n° 536)

Ces deux souches sont pratiquement identiques. Leurs protéinogrammes se caractérisent pour toutes les deux par :

- . l'absence de protéines à pHi situé en zone acide
- . un groupe protéique résolvable en au moins cinq pics dont les pHi moyens sont :

3,75	4,15	6,5	7,4	7,6
------	------	-----	-----	-----
- . Deux blocs dédoublables : l'un dans la gamme de pHi allant de 4,5 à 4,9
: l'autre dans celle allant de 5,4 à 5,9.

Les deux souches diffèrent par un seul pic à pHi 6,7. En effet ce pic se trouve dans le protéinogramme de *Morchella hortensis* (souche n° 536) et manque dans celui de *Morchella* sp. (souche n° 915).

- b) *Morchella intermedia* (souche n° 330) et *Morchella esculenta* (souche n° 130)

Ces deux souches s'avèrent très différentes. Leurs protéinogrammes ne possèdent seulement que deux points communs : une zone acide dans la gamme de pHi allant de 3 à 3,6

un pic de pHi 4,3

Morchella intermedia (souche n° 330) possède des protéines situées dans la zone très acide des pHi et aucune protéine de pHi supérieur à 4,2

Morchella esculenta (souche n° 130) possède des protéines localisées d'une part dans la gamme de pHi allant de 5,4 à 5,9 et d'autre part dans celle allant de 7 à 7,5 (en trois pics).

En conclusion, nous dirons que :

Morchella sp. (souche n° 915) et *Morchella hortensis* (souche n°536) peuvent être considérées comme pratiquement identiques,

Morchella intermedia (souche n° 330) se différencie le plus de *Morchella* sp. et *Morchella hortensis*,

Morchella esculenta (souche n° 130) au contraire se rapproche davantage de *Morchella* sp. et *Morchella hortensis*, d'une part grâce à l'étendue générale de sa gamme de protéines allant de pHi 3,2 à pHi 7,5, d'autre part grâce à la présence de régions communes, notamment vers pHi 4,45 ou pHi 7,5

3.9.2.2. Comparaison entre *Disciotis venosa* (souche n° 129) et *Verpa digitaliformis* (souche n° 627)

Les protéinogrammes de *Disciotis venosa* (souche n° 129) et de *Verpa digitaliformis* (souche n° 627) présentent des différences très nettes :

- Seule *Disciotis venosa* (souche n° 129) possède des bandes protéiques dans la zone fortement acide.

- Seule *Verpa digitaliformis* (souche n° 627) possède des protéines vers pHi 6,3 et vers pHi 7,5.

Les deux souches n'ont d'analogie que pour les pHi moyens :

4,2 4,7 et 5,9

Les protéinogrammes peuvent être comparés à ceux des *Morchella* : nous pouvons alors rapprocher *Disciotis venosa* (souche n° 129) de *Morchella intermedia* (souche n° 330), en particulier par la présence commune de protéines dans la zone acide des pHi.

Verpa digitaliformis (souche n° 627) de *Morchella esculenta* (souche n° 130), en particulier par la présence commune de protéines dans la zone neutre ou alcaline des pHi.

3.10 Précisions apportées par la focalisation sur couche mince de polyamide (Fig. n° 29, 30, 31)

3.10.1 Résultats

Dans le tableau n° 3 nous avons représenté les caractéristiques des protéinogrammes des six Pézizales que nous avons étudiées grâce à la technique de focalisation sur couche mince de polyacrylamide.

3.10.2 Discussion

La focalisation sur couche mince de polyacrylamide nous a permis de constater :

- La présence de bandes protéiques communes aux six souches

En effet une bande protéique importante est commune aux six Pézizales étudiées. Elle est située dans la zone de pH 4. Cette bande se dédouble nettement chez *Morchella hortensis* (souche n° 536), *Morchella* sp. (souche n° 915), *Verpa digitaliformis* (souche n° 627) et beaucoup plus faiblement chez les quatre autres espèces de Pézizales.

- L'identité de *Morchella* sp. (souche n° 915) et *Morchella hortensis* (souche n° 536)

Autant que le permet la précision de la méthode et comme il apparaît sur le schéma n°29 nous conclurons à l'identité de *Morchella hortensis* et de *Morchella* sp. Une seule divergence peut être notée. Elle porte sur la situation plus anodique des bandes comprises entre pH 5,4 et pH 5,6 pour *Morchella hortensis*.

- L'existence de différences et d'analogies entre les quatre *Morchella* étudiées.

Par la situation générale de ses bandes protéiques, toutes comprises entre pH 4 et pH 8 et par l'absence complète de bandes de situation anodique, *Morchella esculenta* (souche n° 130) s'avère proche de *Morchella hortensis* (souche n° 536). Figure n° 30.

Tableau n° 3

CARACTERISTIQUES DES PROTEINOGRAMMES

DES SIX PEZIZALES

(seules les bandes importantes sont comptées)

pHi	<i>Morchella</i> sp (915)	<i>Morchella</i> <i>hortensis</i> (536)	<i>Morchella</i> <i>intermedia</i> (330)	<i>Morchella</i> <i>esculenta</i> (130)	<i>Disciotis</i> <i>venosa</i> (129)	<i>Verpa</i> <i>digitali-</i> <i>formis</i> (627)
2,4 - 2,6	-	-	10	-	5	-
3,8	2	2	2	-	1	3
4	4	3	2	2	2	3
4,7 - 4,9	5	3	1	3	2	1
5,5	-	-	1	2	2	-
5,4 - 5,6	4	2	-	4	-	1
6	2	2	3	-	5	2
7,3 - 7,6	5	6	-	3	-	1
8	-	-	-	-	-	3

Figure n° 29
Protéinogrammes

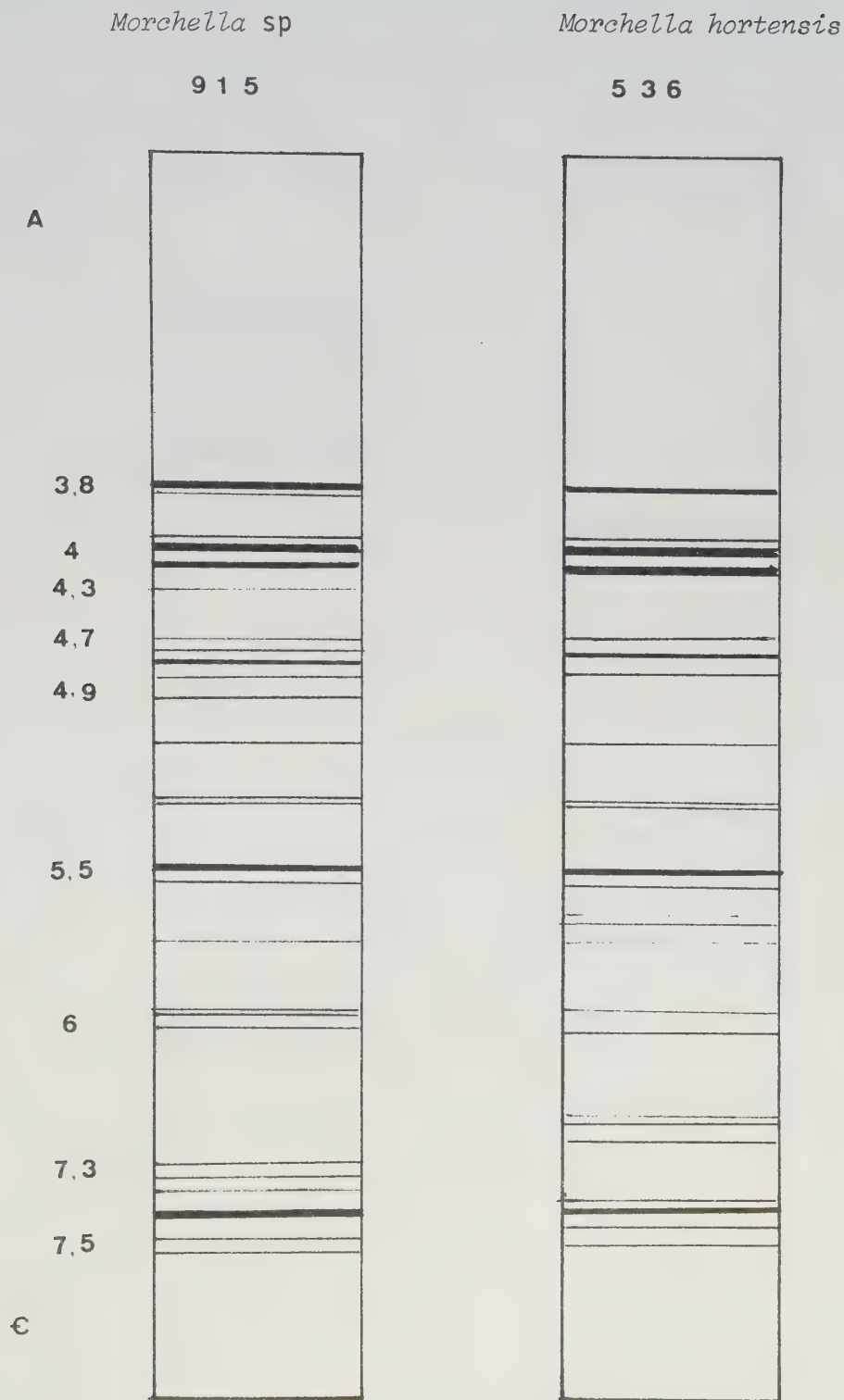


Figure n° 30
Protéinogrammes

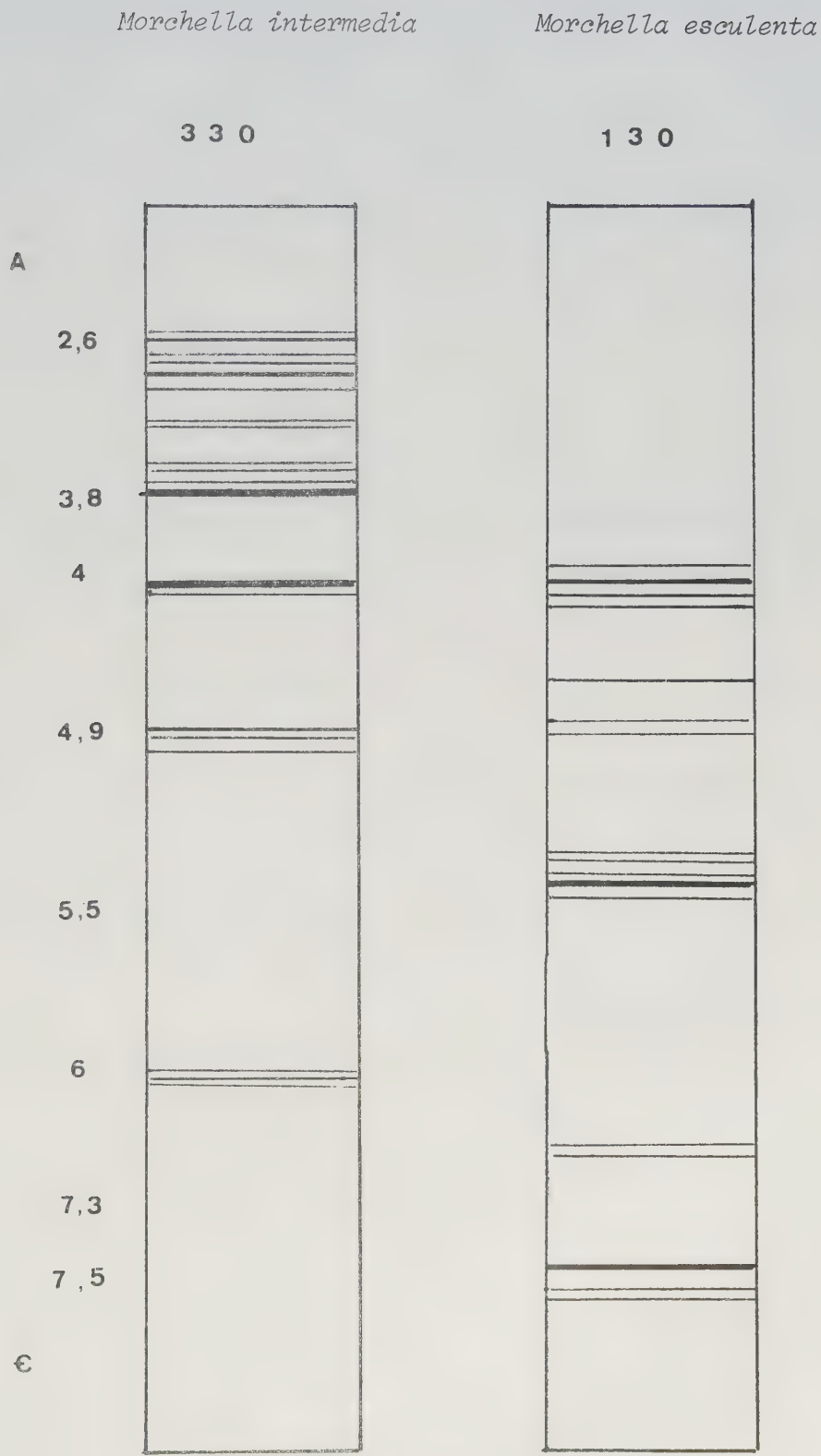
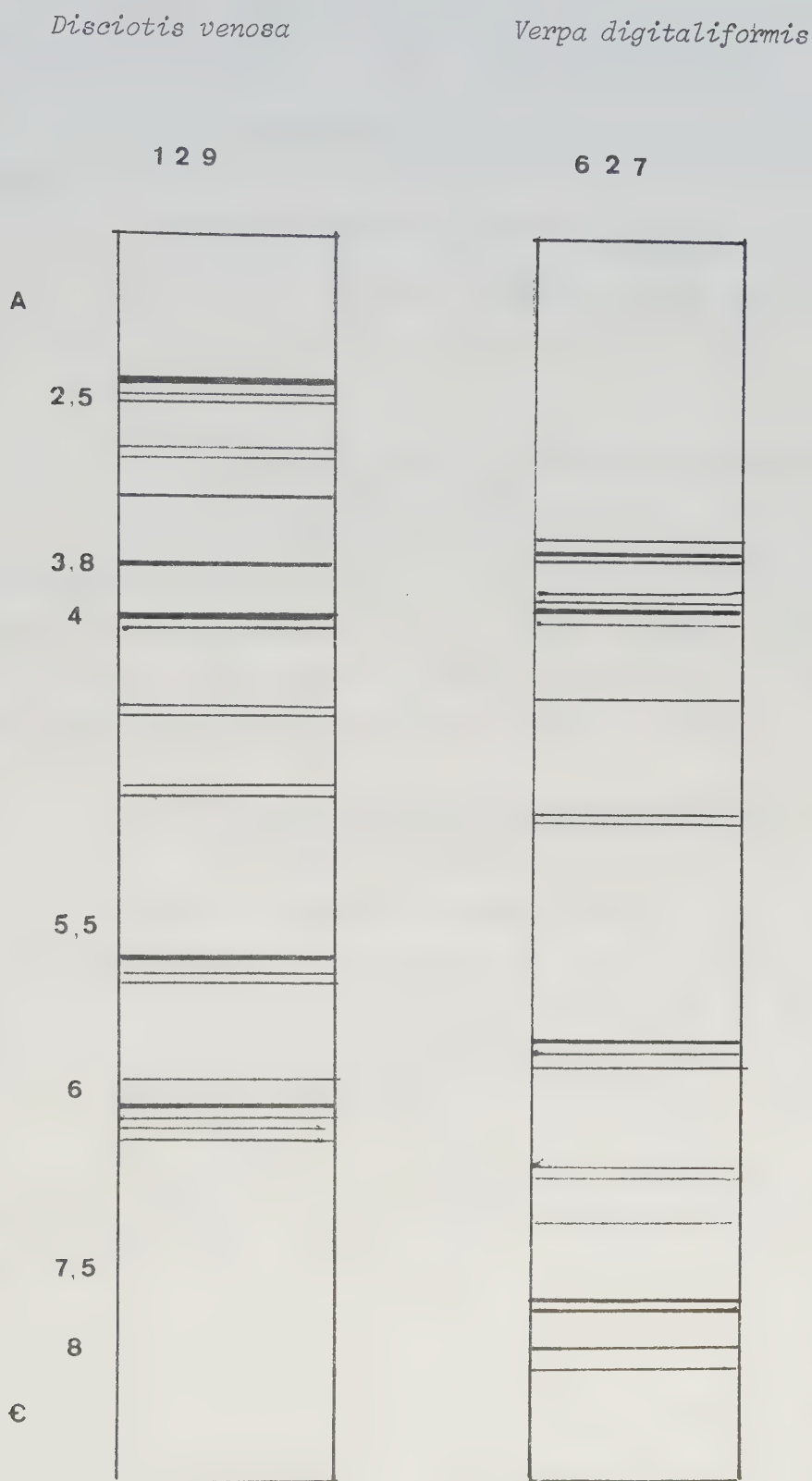


Figure n° 31
Protéinogrammes



Mais le protéinogramme de *Morchella hortensis* se différencie par l'absence d'une part d'une bande nette vers pH 4,8, d'autre part une bande un peu moins importante vers pH 5,5.

Le protéinogramme de *Morchella intermedia* (souche n° 330) est bien différent des précédents. En effet, nous remarquerons :

- la présence de nombreuses bandes -plus de dix- de situation très anodique,
- l'absence de bandes de situation moyenne.
- Par ailleurs, la bande catodique située vers pH 7,5, qui est très nette chez *Morchella hortensis* a disparu. (Fig. n° 30)

- Des bandes protéiques propres à *Disciotis venosa* (souche n° 129) (Fig. n° 31)

Le protéinogramme de *Disciotis venosa* présente une bande importante accompagnée de bandes plus fines autour de pH 6. Ces bandes ne se retrouvent pas chez les autres Pezizales que nous avons étudiées. Par ailleurs la présence de bandes très nettes de situation anodique sur ce protéinogramme évoque celui de *Morchella intermedia* (souche n° 330).

- Un caractère particulier du protéinogramme de *Verpa digitaliformis* (souche n° 627). (Fig. n° 31)

L'absence de bandes franchement anodiques chez *Verpa digitaliformis* éloigne cette souche de *Disciotis venosa* (souche n° 129) et la rapproche de *Morchella esculenta* (souche n° 130). En effet, c'est le seul protéinogramme étudié qui possède deux bandes très intenses et d'autres bandes secondaires dans la zone de PH 7,5 à 8, donc en position nettement catodique.

En conclusion, nous dirons que les résultats obtenus par la focalisation sur couche mince de polyacrylamide confirment et précisent les hypothèses que nous avons pu faire grâce à la focalisation sur colonne d'ampholines.

3.11 Comparaison des six espèces de Pezizales d'après les amino-acides libres

Nous avons étudié les mêmes espèces de Pezizales que pour les protéines d'après leurs amino-acides libres.

3.11.1 Technique employée

Nous avons procédé à la délipidation de 10 g de mycélium essoré dans les mêmes conditions que pour l'extraction des protéines.

Le mycélium a ensuite été extrait par l'alcool à 50° puis nous avons employé la chromatographie sur colonne à l'aide d'un analyseur d'acides aminés Technicon TSM 1. L'exploitation des résultats a eu lieu sur ordinateur PDP 8/E. Ces résultats sont consignés dans le tableau 4 ; ils sont exprimés en micromoles par litre.

TENEUR EN ACIDES AMINÉS DE SIX SOUCHES DE PEZIZALES

(micromoles par litre)

Tableau n° 4

Souches n°	<i>Morchella hortensis</i> (536)	<i>Morchella</i> sp. (915)	<i>Morchella intermedia</i> (330)	<i>Morchella esculenta</i> (130)	<i>Disciotis venosa</i> (129)	<i>Verpa digitaliformis</i> (627)
Azote aminé	0,10	0,12	0,07	0,08	0,25	0,09
Acide aspartique	12	13	10	10	15	14
Thréonine	25	21	10	20	29	19
Sérine	20	24	21	15	14	22
Acide glutamique	4	1	-	3	10	5
Glycocolle	15	12	14	13	10	21
Alanine	8	5	12	-	22	-
Valine	15	10	11	12	27	7
Isoleucine	-	-	7	-	21	-
Leucine	-	-	-	-	18	-
Phénylalanine	-	-	-	-	15	-
Ornithine	-	-	-	-	33	-
Lysine	-	-	-	-	33	-

3.11.2 Discussion

L'examen de ces résultats nous a permis de mettre en évidence à la fois des caractères communs aux six souches de Pezizales et des caractères différentiels.

- Les caractères communs aux six souches de Pezizales

Nous avons noté chez les six Pezizales envisagées la présence :

des acides aminés alcool : sérine et thréonine
du glyocolle et de la valine.

Par contre nous n'avons pas décelé la cystéine, la tyrosine, la proline et les acides aminés hétérocycliques.

Quant aux amino-acides dicarboxyliques : acide aspartique et acide glutamique, ils sont présents chez les Pezizales étudiées. Cependant *Morchella intermedia* ne contient pas d'acide glutamique libre.

- Les caractères différentiels entre les six souches de Pezizales

- Les teneurs en azote aminé, en acide aspartique, acide glutamique, sérine, thréonine, glyocolle, alanine et valine sont très proches chez *Morchella hortensis* (souche n° 536) et chez *Morchella* sp. (souche n° 915). Chez ces deux souches, cinq amino acides sont absents; il s'agit de la leucine, de l'isoleucine, de la phénylalanine, de l'ornithine et de la lysine.

- *Morchella esculenta* (souche n° 130) présente des affinités avec *Morchella hortensis* (souche n° 536). Elle en diffère par l'absence d'alpha alanine et par la présence de lysine.

- *Morchella intermedia* (souche n° 330) se différencie des *Morchella* précédentes par :

- . une teneur plus faible (50 %) en thréonine
- . la présence d'isoleucine
- . l'absence d'acide glutamique.

- *Disciotis venosa* (souche n° 129) se caractérise par sa forte teneur en azote aminé, ainsi qu'en acide glutamique, en alpha alanine, en valine et en isoleucine. De plus, la leucine, la phénylalanine et l'ornithine ne se rencontrent que chez *Disciotis venosa*.

- *Verpa digitaliformis* (souche n° 627) se distingue de *Disciotis venosa* (souche n° 129) par l'absence de leucine, d'isoleucine, de phényl alanine, d'ornithine, de lysine et d'alpha alanine.

4) CONCLUSION

=====

Nous avons noté tout au long de cette étude chimiotaxonomique une réelle convergence entre les résultats obtenus par électrofocalisation et la composition en acides aminés libres des six Pézizales envisagées.

L'emploi de l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide nous a permis d'identifier *Morchella* sp. à *Morchella hortensis*. Le seul examen morphologique ne permettait pas. Cette analogie se retrouve également si nous considérons les acides aminés libres présents chez ces deux souches.

Nous avons remarqué en examinant les protéinogrammes et la composition en acides aminés libres de ces différentes espèces que :

- *Morchella intermedia* se caractérise par de nombreuses bandes protéiques de situation très anodique, par l'absence de bandes de situation moyenne et par une bande catodique située vers pH 7,5.

- *Morchella esculenta* ne possède pas de bandes de situation anodique et se rapproche de *Morchella hortensis*. Ce fait est confirmé par les teneurs en acides aminés libres.

- *Disciotis venosa* s'individualise par une bande protéique vers pH 7 et possède des bandes anodiques comme *Morchella intermedia*.

Des six Pézizales examinées *Disciotis venosa* est la seule à contenir de la leucine, de la phénylalanine et de l'ornithine.

- *Verpa digitaliformis* se caractérise par la présence de deux bandes nettes de situation catodique. Par ailleurs, son protéinogramme se rapproche de celui de *Morchella esculenta*.

Les six Pézizales que nous avons étudiées possèdent une bande protéique importante dans la zone de pH 4. Par ailleurs certains acides aminés libres sont absents chez toutes les souches; c'est le cas de la cystéine, de la tyrosine et des acides aminés hétérocycliques. De tels faits constitueraient des arguments favorables à la classification envisagée par BOUDIER et modifiée par Madame LE GALL (15) et nous conduiraient à regrouper ces six espèces dans la famille des Morchellacées. Nous envisageons pour l'avenir de réaliser encore des protéinogrammes sur des espèces appartenant aux genres *Helvella* et *Acetabula* afin de confirmer cette hypothèse.

CHAPITRE IV

APPLICATION DE L'ELECTRO-FOCALISATION A LA
SYSTEMATIQUE DE QUELQUES CONIFERALES

1) ETAT DES TRAVAUX DE CHIMIOTAXINOMIE MACROMOLECULAIRE

=====

APPLIQUES AUX GYMNOSPERMES

=====

Peu de travaux ont été consacrés à la chimiotaxinomie macromoléculaire des Gymnospermes. Nous pouvons citer ceux de DURZAN et CHALUPA (41). Ces auteurs ont sélectionné des graines de *Pinus Banksiana* Lamn provenant de quinze régions différentes. Ils ont distingué sur les protéinogrammes les protéines embryonnaires et les protéines du gamétophyte femelle et envisagé l'influence de divers facteurs chimiques. Enfin, ils ont pu identifier certains écotypes non décelables morphologiquement.

Toutes ces recherches ont utilisé comme technique l'électrophorèse simple. Il nous a paru intéressant d'appliquer l'électrofocalisation sur gel de polyacrylamide à l'étude des protéinogrammes de quelques Gymnospermes d'autant que les mises au point les plus récentes (103a) confirment la rareté des recherches en ce domaine.

2) RECHERCHES PERSONNELLES

=====

2.1. Raison du choix des graines de Coniférales

Nous avons à notre disposition des graines sélectionnées de diverses Coniférales. Il nous a semblé intéressant de réaliser leurs protéinogrammes et d'envisager une exploitation de ces résultats en chimiotaxonomie.

Il convient de préciser que ces recherches ont eu lieu postérieurement à celles que nous avons réalisées sur les Solanacées. Ce fait explique le choix de la méthode de focalisation sur couche mince de polyacrylamide.

2.2. Position systématique des Coniférales

Nous nous sommes limités chez les Gymnospermes à l'étude de quelques Coniférales.

Cet ordre comporte trois familles :

- Chez les Taxacées : les ovules sont d'origine caulinaire, ils sont dressés. Il n'y a pas de cônes.
- Chez les Abiétacées : les ovules sont d'origine foliaire, ils sont renversés. Il y a des cônes. Les graines sont protégées par des écailles.
- Chez les Cupressacées : nous retrouvons des caractères analogues à ceux des Abiétacées, mais les ovules sont dressés.

Les espèces que nous avons étudiées appartiennent à la famille des Abiétacées et plus précisément à la sous-famille des Abiétées.

Dans cette sous-famille, la bractée mère est toujours indépendante de l'écaille ovulifère; cette dernière porte deux ovules renversés. Chaque étamine comporte deux sacs polliniques.

Chez les Abiétées nous trouvons les genres : *Pinus*, *Abies*, *Cedrus*, *Larix*, *Picea* et *Tsuga*.

Nos travaux ont porté sur les protéines solubles des graines de cinq espèces du genre *Pinus* : *Pinus excelsa wallichiana*, *Pinus strobus* L., *Pinus coulteri* D., *Pinus nigra* L., *Pinus pinea* L.

de deux espèces du genre *Abies* : *Abies cephalonica* et *Abies pinsapo glauca*

de deux variétés du genre *Cedrus* : *Cedrus atlantica glauca* et *Cedrus atlantica argentea*.

2.3. Description des espèces étudiées

Le genre *Pinus*

Le genre *Pinus* comprend des arbres possédant des rameaux longs porteurs de petites écailles à l'aisselle desquelles naissent des rameaux courts porteurs de feuilles aciculaires. Selon les espèces ces feuilles sont groupées par 2, par 3 ou par 5 ce qui permet la division du genre en plusieurs sections :

- la section Pinaster correspond aux Pins à deux feuilles
- la section Toeda comprend les pins à trois feuilles
- la section Strobis est constituée par les pins à 5 feuilles.

Les cônes ne mûrissent qu'au bout de deux ou trois ans; leurs bractées mères sont très réduites.

Nous nous sommes intéressés aux espèces suivantes :

Dans la section Pinaster :

- *Pinus pinea* L.

C'est le pin pignon ou pin parasol

Ses graines sont longues et mesurent 15 à 20 mm de long. Elles sont dépourvues d'aile et possèdent un testa très dur. L'amande est comestible.

Les graines étudiées proviennent d'Espagne.

- *Pinus austriaca* Link. = *Pinus nigra* Link.

Il s'agit du pin noir d'Autriche. Ce pin possède des graines ailées.

Nous avons travaillé sur des graines provenant d'Autriche.

Dans la section Toeda :

- *Pinus coulteri* D. Don.

Les graines que nous avons utilisées proviennent de Californie

Dans la section Strobis :

- *Pinus strobus* L.

C'est le pin Weymouth ou pin blanc du Canada.

Les graines ont été récoltées en Italie.

- *Pinus excelsa* Wall. = *Pinus wallichiana* A.B. Jackson.

Il s'agit du Pin pleureur ou Pin de Bhotan. Il est originaire de l'Himalaya. Voisin bien que différent du *Pinus strobus* il a été longtemps confondu avec lui.

Cette espèce est différente de *Picea excelsa* Link. qui est un *Epicea* rencontré dans le Nord de l'Europe.

Les graines sur lesquelles nous avons travaillé proviennent de l'Himalaya.

Le genre *Abies*

Les *Abies* sont de beaux arbres à port dressé. Les feuilles insérées en spirale sont ramenées sur le même plan par torsion ; il n'existe que des rameaux longs. Les cônes sont dressés, allongés et possèdent des écailles caduques.

Nous avons étudié dans ce genre deux espèces :

- *Abies pinsapo* Boiss. var. *glauca*

C'est le Pinsapo. Les graines dont nous disposons sont originaires d'Italie.

- *Abies cephalonica* Link.

Cette espèce se rencontre dans les montagnes de la Grèce. Les graines proviennent d'ailleurs de Grèce.

Le genre *Cedrus*

Les Cèdres sont de grands et beaux arbres majestueux à branches fortes, rameuses, étalées horizontalement lorsqu'ils sont adultes. Les feuilles sont persistantes. Elles sont insérées soit par touffes sur des rameaux courts, soit isolément sur des rameaux longs. Les cônes dressés possèdent des écailles larges, minces et caduques.

Pour certains Systématiciens, ce genre comporte trois espèces :

Cedrus atlantica Masset.

Cedrus deodara Loudon

Cedrus libani Barre

Pour d'autres il n'y aurait qu'une seule espèce : *Cedrus libani* qui comporterait des variétés.

Les graines sur lesquelles nous avons travaillé portaient la

la mention *Cedrus atlantica* var. *glauca* et *Cedrus atlantica* var. *argentea*. Si nous avons conservé cette dénomination elle ne saurait nous satisfaire pleinement, en effet nous avons trouvé un *Cedrus libani* Barrel var. *glauca* et un *Cedrus libani* Barrel var. *argentea*. Compte tenu de ces réserves les résultats des protéinogrammes ne seront significatifs que pour le genre *Cedrus*.

2.4. La préparation des extraits de graines

La préparation des extraits protéiques nous a posé moins de problèmes que celle des graines d'Angiospermes. En effet les graines des Coniférales envisagées contiennent relativement peu de polyphénols.

Nous avons utilisé 20 grammes de graines délipidées par l'éther de pétrole. L'extraction des protéines est effectuée avec 200 ml de TRIS HCl (pH = 7,5). Nous avons ajouté à ce tampon du dithiothréitol 0,5 mM et 25 g de polyvinyl pyrrolidone insoluble. L'extrait a été centrifugé puis concentré sur boyau de dialyse contre un tampon de glycolle.

2.5. Conditions d'emploi de l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide

Nous avons procédé à l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide selon les conditions décrites dans les techniques générales. La gamme d'ampholines employée assure une gamme de pH s'étalant de 3 à 11.

2.6. Comparaison de quelques Abiétacées d'après leurs protéinogrammes

2.6.1 Les Résultats

Les protéinogrammes de ces différentes Abiétacées sont schématisés sur les figures n° 32, 33, 34, 35.

Nous avons indiqué les bandes protéiques observées sur les protéinogrammes des graines des divers *Pinus* dans le tableau n° 5. Le tableau n° 6 est consacré aux autres espèces.

Tableau n° 5

Nombre de bandes protéiques observées sur les
protéinogrammes des graines de divers *Pinus*

pH	<i>Pinus excelsa wal- lichiana</i>	<i>Pinus nigra</i>	<i>Pinus pinea</i>	<i>Pinus strobus</i>	<i>Pinus coulteri</i>
3 - 4	-	7	2	-	4
4 - 5	-	5	3	4	1
5 - 6	-	5	2	2	3
6 - 7	2	6	4	3	4
7 - 8	-	-	1	-	1
8 - 9	-	2	2	2	2
9 - 10	-	-	-	-	-
10 - 11	-	3	3	-	-
Total	2	28	15	11	15

Tableau n° 6

Nombre de bandes protéiques observées sur les
protéinogrammes des graines de *Cedrus* et d'*Abies*

pH	<i>Cedrus atlantica glauca</i>	<i>Cedrus atlantica argentea</i>	<i>Abies cephalonica</i>	<i>Abies glauca</i>
3 - 4	-	-	-	-
4 - 5	5	1	4	2
5 - 6	4	1	5	4
6 - 7	3	3	6	6
7 - 8	6	3	-	-
8 - 9	6	2	-	-
9 - 10	-	-	-	-
10 - 11	2	2	-	-
Total	26	13	15	12

2.6.2 Interprétation de ces protéinogrammes

- Deux bandes protéiques importantes, situées entre pH 6,6 et pH 6,8, sont communes à toutes les espèces d'Abiétacées étudiées. Ce sont les seules bandes nettement visibles sur le protéinogramme de *Pinus excelsa wallichiana*.

- Le protéinogramme des graines de *Pinus nigra* est le plus riche en bandes: il en possède une trentaine. Nous avons noté les points suivants : (figure 32)

- . la plupart des bandes se trouve entre pH 7 et pH 3
- . les bandes les plus importantes sont groupées vers pH 3, pH 4 et pH 4,6
- . trois bandes sont situées en position catodique; deux d'entre elles sont très importantes; elles se trouvent vers pH 10 et pH 11.

- Le protéinogramme de *Pinus pinea* présente une quinzaine de bandes. Leur répartition générale est proche de celle observée chez *Pinus nigra* (figure 32)

Nous signalerons d'une part :

- . les bandes situées vers pH 3 et vers pH 4,6

d'autre part :

- . les bandes catodiques entre pH 10 et pH 11.

- Les graines de *Pinus strobus* ont donné un protéinogramme relativement pauvre. Nous remarquerons que : (figure 33)

- . la présence vers pH 5 de plusieurs bandes régulièrement espacées mérite d'être mentionnée; ce protéinogramme est en effet le seul à les présenter.

Nous avons également noté :

- . l'absence de bandes de situation catodique.

- Le protéinogramme de *Pinus coulteri* est plus varié que celui de *Pinus strobus*. Il possède une quinzaine de bandes. Nous pouvons signaler : (figure 33)

- . la présence de bandes de situation anodique vers pH 3
- . l'absence de bandes vers pH 5
- . l'absence de bandes de situation catodique.

- Le protéinogramme des graines de *Pinus excelsa wallichiana* nous pose un problème. Seules deux bandes protéiques, localisées entre pH 6,6 et pH 6,8 et communes à toutes les Abiétacées étudiées, s'avèrent nettes. Les autres bandes sont trop faibles pour être retenues pour une lecture précise. Il conviendrait de refaire une extraction et un protéinogramme sur des graines d'une autre origine afin de voir si cela provient d'une mauvaise conservation des échantillons

- Les graines de deux variétés du genre *Cedrus* : *Cedrus atlantica glauca* et *Cedrus atlantica argentea* ont été examinées. (figure 34)

- Le protéinogramme de *Cedrus atlantica glauca* présente 26 bandes, celui de *Cedrus atlantica argentea* n'en a que treize bien individualisées.

Toutefois ces 13 bandes sont communes aux deux protéinogrammes. Nous avons noté entre autre la présence de :

- . deux bandes très proches vers pH 11

Nous n'avons pas retrouvé ces bandes sur les protéinogrammes des autres Abiétacées

- . un groupe de bandes très nettes entre pH 7,5 et 8,5 qui semble également ne se rencontrer que sur les protéinogrammes de ces deux *Cedrus*.

Pour les deux *Abies* étudiés : *Abies cephalonica* et *Abies glauca* les protéinogrammes des graines s'avèrent très proches. Ils possèdent une quinzaine de bandes localisées entre pH 4 et pH 7. (figure 35)

Le protéinogramme d'*Abies cephalonica* se différencie par la présence d'une bande nette doublée d'une bande plus mince vers pH 4.

CONCLUSION

=====

L'étude des protéinogrammes des graines de ces neuf Abiétacées nous a permis de constater la présence de deux bandes protéiques situées entre pH 6,6 et 6,8 communes aux 9 espèces.

L'une des espèces du genre *Pinus* : *Pinus excelsa wallichiana* nous a fourni un protéinogramme dont les bandes étaient trop faibles pour permettre son étude.

L'existence de bandes catodiques importantes et de bandes anodiques vers pH 3 permet de rapprocher *Pinus pinea* et *Pinus nigra* . Ce fait peut être rapproché de l'appartenance de ces *Pinus* à la section Pinaster.

L'absence de bandes catodiques a été mentionnée simultanément chez *Pinus strobus* (section *Strobus*) et *Pinus coulteri* (section *Toeda*), mais les protéinogrammes demeurent bien individualisés avec un groupe de bandes vers pH 5 chez *Pinus strobus* et des bandes anodiques entre pH 3 et pH 4 chez *Pinus coulteri*.

Nos deux *Cedrus* se caractérisent parmi les Abiétacées envisagées par la présence sur leurs protéinogrammes de deux bandes catodiques très proches l'une de l'autre.. Par ailleurs la position des bandes caractéristiques s'avère identique chez *Cedrus atlantica glauca* et *Cedrus atlantica argentea* et confirme qu'il s'agit bien de variétés.

Enfin les protéinogrammes des deux *Abies* se distinguent par leurs bandes toutes comprises entre pH 4 et pH 7. *Abies cephalonica* possède une bande vers pH 4 qui manque chez *Abies pinsapo glauca*.

Les deux *Abies* présentent des protéinogrammes de graines distincts des autres genres par la situation de toutes leurs bandes entre pH 4 et pH 7.

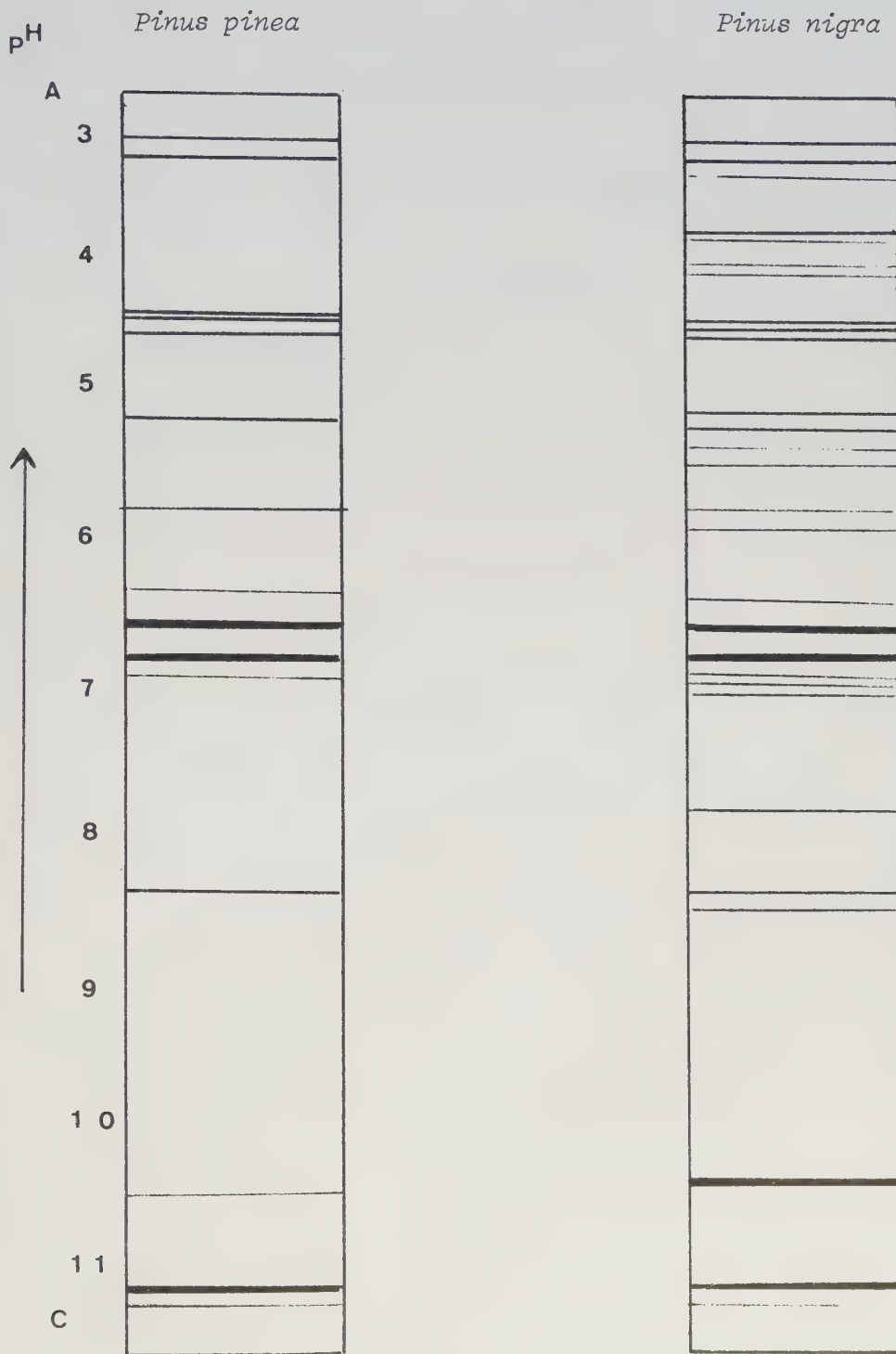
La présence d'une bande vers pH 4 permet toutefois de distinguer *Abies cephalonica* d'*Abies pinsapo glauca*.

L'examen des protéinogrammes des graines d'Abiétacées semble donc permettre la différenciation des genres *Pinus*, *Cedrus* et *Abies*. A l'intérieur du genre *Pinus* des analogies semblent exister entre *Pinus* d'une même section, il conviendrait de confirmer cette hypothèse en réalisant les protéinogrammes de plusieurs *Pinus* appartenant aux sections *Pinaster*, *Toeda* et *Strobus*.

Pinus pinea et *Pinus nigra*

Protéinogrammes

Figure 32
Protéinogramme



Pinus strobus et *Pinus coulteri*

Protéinogrammes

Figure 33
Protéinogramme



Cedrus atlantica argentea et *Cedrus atlantica glauca*

Protéinogrammes

Figure 34
Protéinogramme

Cedrus atlantica argentea

Cedrus atlantica glauca

pH

A

3

4

5

6

7

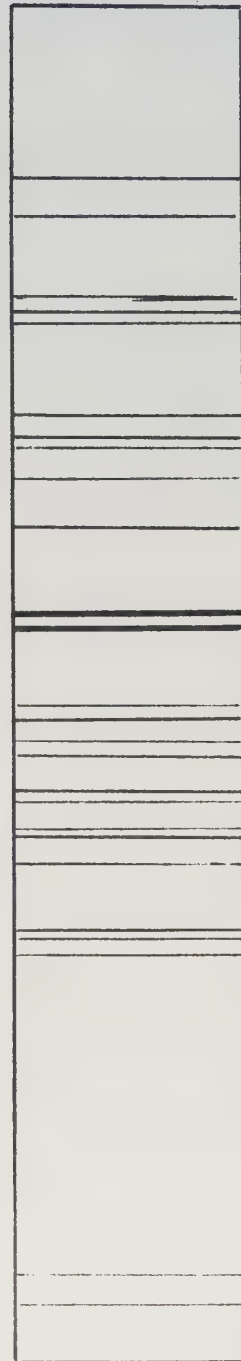
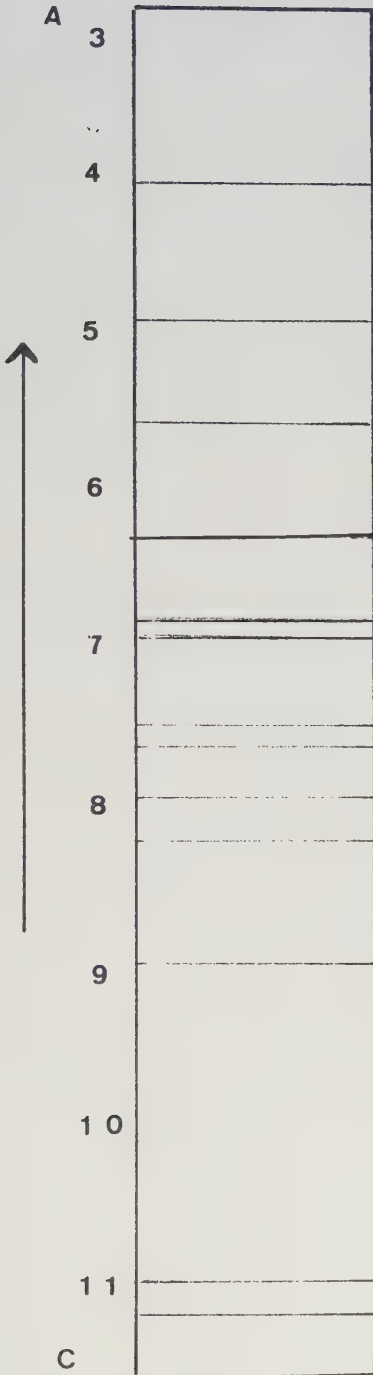
8

9

10

11

C

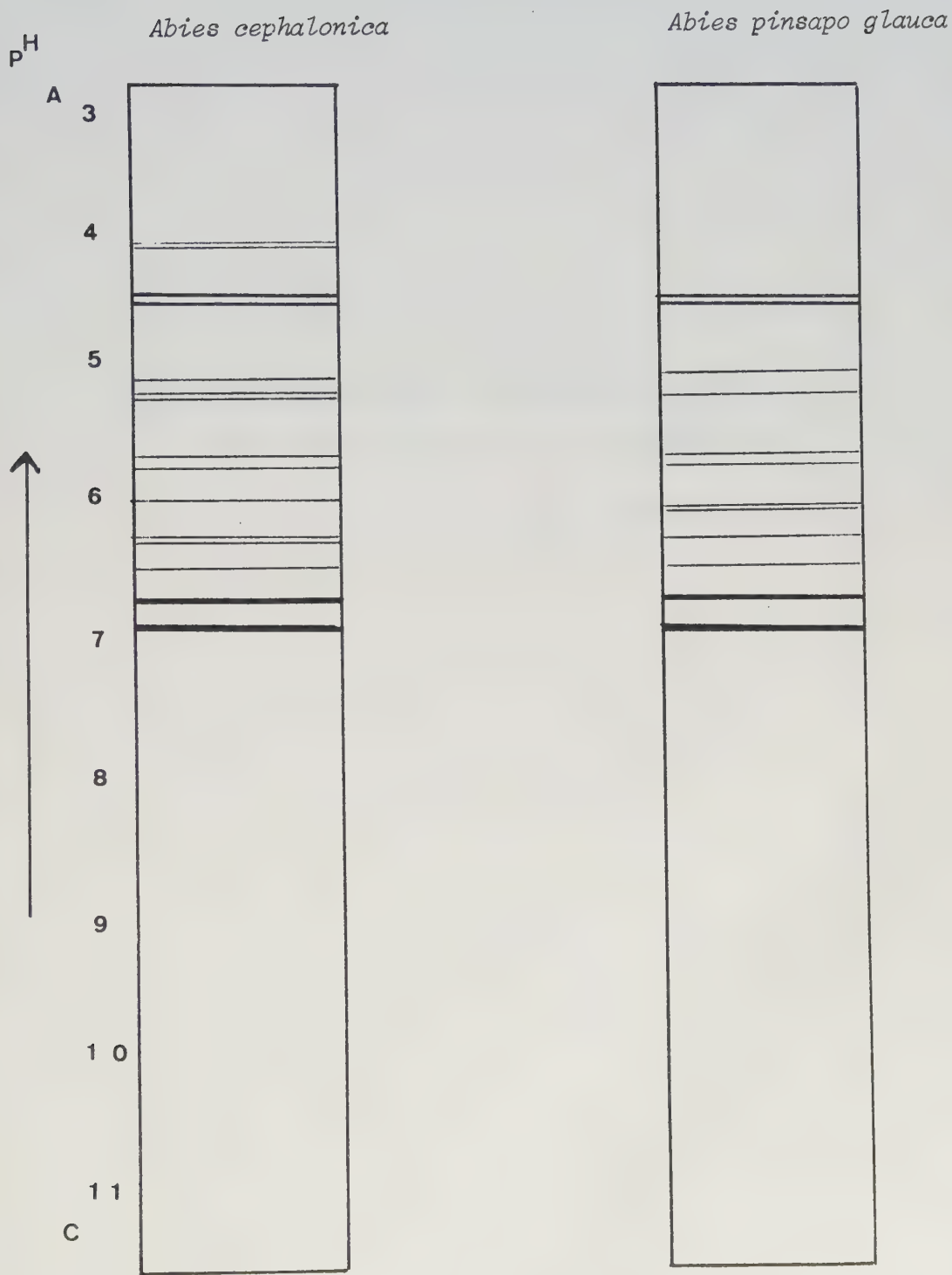


Abies cephalonica et *Abies pinsapo glauca*

Protéinogrammes

Figure 35

Protéinogramme



CHAPITRE V

APPLICATION DE L'ELECTROPHORESE ET DE
L'ELECTROFOCALISATION A LA SYSTEMATIQUE
DE QUELQUES ANGIOSPERMES

1) ETAT DES TRAVAUX DE CHIMIOTAXONOMIE MACROMOLECULAIRE
=====

APPLIQUES AUX ANGIOSPERMES
=====

L'étude des protéines végétales des Angiospermes en vue d'une application en chimiotaxonomie n'a été abordée que depuis une dizaine d'années. La phylogénèse et la génétique ont également bénéficié de ces recherches. Nous envisagerons successivement les travaux portant sur des racines, sur des tubercules, sur des feuilles et sur des graines.

1.1. Travaux effectués sur des racines

Peu de travaux ont étudié les protéines solubles des racines dans un but taxonomique. Nous citerons ceux de DUMITRESCU et CARTIER en 1971 (38). Ces auteurs se sont intéressés au genre *Plantago*. Après une étude des isopéroxydases radicales, ils ont pu distinguer les espèces de la section *Coronopus* et de la section *Oreades*.

1.2. Travaux effectués sur des tubercules

Les protéines solubles des tubercules ont été peu étudiées. Nous signalerons les recherches de DESBOROUGH et PELOQUIN (35) sur des tubercules de diverses espèces du genre *Solanum*. Ces auteurs ont obtenu des résultats discordants. En effet sur les protéinogrammes totaux il est possible de distinguer les diverses espèces de *Solanum*. Par contre, l'examen des électrophorégrammes des iso-estérases ne le permet pas.

1.3. Travaux effectués sur des feuilles

Les travaux effectués sur les protéines solubles des feuilles sont plus nombreux.

En 1966 HART et BHATIA (66) ont étudié les protéinogrammes foliaires de six espèces du genre *Nicotiana*. Nous reprendrons leurs conclusions :

Les protéinogrammes foliaires contiennent en moyenne une dizaine de bandes et permettent de distinguer les six espèces de *Nicotiana*.

Pour une espèce donnée, les protéinogrammes présentent des variations en fonction de l'environnement et de l'emplacement des feuilles sur les plantes. Les protéinogrammes des feuilles apicales diffèrent de ceux fournis par les feuilles de la base.

Pour les électrophorégrammes des iso-estérases ou iso-péroxydases, la distinction entre ces espèces est moins nette. Cette contradiction est à rapprocher de ce qui a été signalé précédemment dans le genre *Solanum*.

- Une corrélation entre les variations qualitatives des iso-péroxydases d'*Hippocrepis comosa* L. et les degrés de polyploidie de cette espèce a été établie par DUMITRESCU et GUERN (39).

- MAC COWN (95) a également utilisé les zymogrammes pour distinguer les clones Wyoming, Plumarius et Scania de *Dianthus caryophyllus* L.

- Un travail très étendu a été effectué par ROUGE en 1971 (113). Il a comparé les protéinogrammes foliaires de diverses espèces de Papilionacées appartenant à un même genre et à des genres voisins. Pour des écotypes d'altitude de *Lotus corniculatus* et de *Taraxacum officinale*, il a montré que l'électrophorèse des protéines foliaires permet de préciser le rôle des facteurs du milieu dans les phénomènes de spéciation. Il a par ailleurs précisé les affinités entre Fumariacées et Papavéracées.

1.4. Travaux effectués sur des graines

Les protéines solubles (albumines et globulines) des graines ont été les plus utilisées en chimiotaxonomie. Les premiers résultats obtenus par FOX(52) remontent à 1964. Les graines constituent un matériel de choix pour plusieurs raisons :

- Leurs protéines sont les mieux connues sur les plans physiologiques et biochimiques.

- L'extraction de leurs protéines solubles pose moins de problèmes que pour celle des autres organes. Ce point de vue, partagé par tous les auteurs, nous semble discutable dans certains cas.

- Leurs protéines sont moins sensibles à l'environnement que celles des autres organes végétaux.

Nous avons regroupé ces travaux en nous basant sur la classification botanique.

1.4.1 Les graines de Monocotylédones

Les protéines des graines de Monocotylédones ont fait l'objet de nombreuses recherches. Nous nous limiterons aux résultats les plus significatifs :

- L'instabilité des caractères morphologiques dans le genre *Yucca* pose des problèmes à la Systématique traditionnelle. En 1970 C.M. SMITH (121) a réalisé les protéinogrammes de divers *Yucca* et a pu préciser la position de six taxons.

Le genre *Dioscorea* comprend une centaine d'espèces. Certaines ont une valeur alimentaire, d'autres fournissent des stéroïdes précurseurs de la cortisone. Les travaux de MIEGE (103) ont porté sur quatre taxons. Les protéinogrammes généraux et les zymogrammes des iso-amylases ont permis de les répartir en quatre sections différentes.

AUTRAN et BOURDET (8) ont effectué l'isolement des gliadines de diverses espèces du genre *Hordeum*. Ce type de protéines, proches des histones animales, échappe aux influences de l'environnement et s'avère intéressant du point de vue chimiotaxonomique. Les gliadines ont été ensuite séparées par électrophorèse.

LADIZINSKY et JOHNSON (84) ont réalisé des protéinogrammes à partir des caryopses de neuf espèces du genre *Avena*. Certaines de ces espèces étaient diploïdes, d'autres étaient polyploïdes. Ils ont pu préciser ainsi des relations qu'il n'avait pas été possible d'établir par la cytologie.

En travaillant sur les genres *Secale* et *Triticale*, JOHNSON et HALL (74) ont montré que le protéinogramme d'un amphiploïde correspond à la somme des fractions des espèces parentales. L'effet de chaque parent sur l'amphiploïde est bien proportionnel à son génome.

Les protéinogrammes des protéines solubles des caryopses de divers *Triticinae* ont été étudiés par COULSON (26) puis par JOHNSON et HALL (74). Les auteurs ont montré que l'espèce hexaploïde *Triticum aestivum* provient de l'espèce tétraploïde *Triticum dicoccum* et de l'espèce diploïde *Triticum monococcum*. Pour les cytologistes, une autre espèce diploïde : *Aegilops squarrosa* pouvait être un parent présumé. Les protéinogrammes ont tranché la question et éliminé cette dernière hypothèse.

D'autres travaux ont montré que dans une série polyploïde, la complexité des bandes protéiques croît avec le degré de polyploidie.

1.4.2 Les graines de Dicotylédones

Les protéinogrammes des graines ont été réalisées chez des Dicotylédones appartenant à des familles variées : Juglandacées, Chenopodiacees, Crucifères, Légumineuses, Ombellifères, Solanacées, Rubiacées, Composées.

CLARKSON (24) a comparé les protéinogrammes de graines de *Juglans nigra* (Juglandacées).

Les protéinogrammes de ces graines récoltées dans 17 stations différentes des Etats-Unis lui ont permis de déduire le centre d'origine de l'espèce et les directions d'extension.

Dans la famille des Chenopodiaceae UNGAR et BOUCAUD (131) ont étudié huit espèces du genre *Sueda*; ils ont précisé leurs relations d'après les profils électrophorétiques de leurs protéinogrammes.

VAUGHAN, WAITE et BOULTER (133) ont étudié les protéinogrammes des graines de Crucifères. Leurs conclusions sont en accord avec la morphologie et la cytologie. Ils notent en effet des relations étroites entre *Brassica campestris* et *Brassica oleracea*. Le protéinogramme de *Brassica nigra* se différencie nettement de ceux des deux espèces précédentes mais présente certaines homologues avec ceux du genre *Sinapis*.

Les protéines des Légumineuses ont été les plus étudiées; les premiers travaux ont été réalisés par FOX (52). Une mise au point complète a été faite par HARBORNE, BOULTER et TURNER (65).

CROWDEN (29) a examiné les profils protéiques de graines d'Ombellifères appartenant à huit tribus. Cette étude lui a permis de rapprocher les tribus des Apiées et des Daucées, des Coriandrées et des Smyrniées, des Scandiées et des Peucedanées.

Dans le genre *Nicotiana* (Solanacées) les zymogrammes des espèces amphiploides correspondent à la superposition de ceux des parents. Pour SHEEN (119) de fait suggère la présence d'allèles codominants.

Selon CENTI-GROSSI (19) de nombreuses variétés de *Coffea arabica* (Rubiaceae) peuvent être distinguées d'après les diagrammes électrophorétiques de leurs graines.

Les protéinogrammes et les zymogrammes de divers *Leucanthemum* (Composées) ont été réalisés par MIEGE (103 b). Ces résultats lui ont permis de distinguer *Leucanthemum proecox* des autres taxons de *Leucanthemum vulgare*.

2) COMMENTAIRE DE CES TRAVAUX

=====

Les travaux précédents nous permettent de retenir les points suivants :

- Les graines représentent un matériel de choix pour l'établissement des protéinogrammes ou des zymogrammes.

- Les résultats des protéinogrammes et ceux des zymogrammes manifestent des discordances dans certains cas. Malgré la très grande finesse de résolution des zymogrammes il semble que les protéinogrammes généraux se prêtent mieux à la distinction entre espèces.

- Les protéinogrammes permettent de suivre une différenciation et d'observer l'effet des gènes au cours du développement.

- Les taxons peuvent être mis en évidence sur les protéinogrammes.

- Les fractions d'un protéinogramme suivent une loi d'additivité. En effet, le nombre de fractions d'un amphiploïde correspond à la somme des fractions trouvées dans les protéinogrammes parentaux.

- Cette loi présente des exceptions; dans certains cas, des bandes nouvelles apparaissent chez l'hybride. Nous pouvons penser que des protomères parentaux se sont réunis chez l'hybride en une molécule nouvelle.

- Dans un certain nombre de cas, les protéinogrammes permettent de déterminer l'origine d'une espèce et son extension géographique.

3) RECHERCHES PERSONNELLES

=====

3.1. Raisons du choix des graines de Solanacées

A ce jour et à notre connaissance, les travaux effectués sur les graines d'Angiospermes n'ont pas concerné des espèces importantes du point de vue pharmaceutique.

C'est une des raisons pour laquelle nous avons choisi les graines de diverses Solanacées. Nous nous sommes intéressés surtout aux espèces riches en alcaloïdes. Nous avons d'abord comparé plusieurs espèces du genre *Datura* : *Datura stramonium* L., *Datura tatula* L., *Datura inermis* et *Datura metel*. Ensuite nous avons comparé les protéinogrammes des graines de *Datura stramonium* L. avec ceux des graines d'*Atropa belladonna* de divers *Hyoscyamus* et de *Scopolia stramonifolia*.

3.2. Position systématique des Solanacées

Selon EMBERGER (44) la famille des Solanacées appartient au vaste ordre des Tubiflorales. Toutefois comme beaucoup d'auteurs, nous avons préféré conserver la classification de BENTHAM et HOOKER et situer les Solanacées dans l'ordre des Polémoniales.

Les Solanacées sont habituellement des herbes. Certaines cependant sont des arbrisseaux. Les feuilles sont alternes et sans stipules. Les fleurs sont solitaires ou groupées en cymes; elles sont habituellement actinomorphes et pentamères. Nous notons cependant une tendance à la zygomorphie.

Le calice est toujours pentamère et habituellement gamosépale. L'androcée comporte cinq étamines mais l'étamine postérieure manifeste une tendance à l'avortement.

Le gynécée est constitué par deux carpelles obliquement placés par rapport au plan antéro-postérieur de la fleur. Les ovules sont anatropes ou faiblement campylotropes. Le fruit est une baie polysperme ou une

capsule. Cette capsule est habituellement septicide; toutefois la déhiscence est pyxidaire chez la Jusquiame.

Les graines sont albuminées. Selon la disposition de l'embryon, la famille est divisée en deux groupes : les Solanacées curvembryées et les Solanacées rectembryées.

Nous adopterons pour les Solanacées la classification suivante (36)

Solanacées curvembryées

- . Le fruit est une baie : Atropées : *Atropa*
- . Le fruit est une capsule septicide ou septifrage ou une pyxide
Hyoscyamées : *Datura*, *Hyoscyamus*,
Scopolia.

Solanacées rectembryées

- . Cinq étamines égales ou inégales :
Cestrinées : *Nicotiana*, *Cestrum*
- . Quatre ou deux étamines fertiles, inégales, fleur zygomorphe :
Salpiglossidées : *Salpiglossis*,
Petunia.

3.3. Description des espèces étudiées

Atropa belladonna L.

La Belladone est une grande herbe à racine vivace et à tige ramifiée. Les feuilles sont alternes sur les rameaux végétatifs, gémées sur les rameaux florifères. Les fleurs sont isolées, régulières et pentamères. Le calice gamosépale reste accrescent autour du fruit. La corolle en forme de coupe profonde est brun pourpre. Elle porte cinq étamines égales. Le fruit est une baie globuleuse d'un noir violacé. Les graines sont noires, réniformes et de surface chagrinée. La Belladone renferme des alcaloïdes comme l'hyoscyamine et l'atropine.

Datura stramonium L.

La Belladone est une grande herbe à racine vivace et à tige ramifiée. Les feuilles sont alternes sur les rameaux végétatifs, géminées sur les rameaux florifères. Les fleurs sont isolées, régulières et pentamères. Le calice gamosépale reste accrescent autour du fruit. La corolle en forme de coupe profonde est brun pourpre. Elle porte cinq étamines égales. Le fruit est une baie globuleuse d'un noir violacé. Les graines sont noires, réniformes et de surface chagrinée. La Belladone renferme des alcaloïdes comme l'hyoscyamine et l'atropine.

- Le genre *Datura*

Le genre *Datura* est l'un des plus étudiés de la famille des Solanacées. Nous citerons les travaux de SAFFORD (DEBELMAS) (32) Il se caractérise par ses fleurs gamopétales solitaires, pédonculées, généralement de grande taille. La corolle est tubuleuse ou infundibuliforme. L'ovaire, supère, est biloculaire au sommet puis divisé en quatre loges par un faux septum. Le fruit est une capsule lisse ou épineuse; il s'ouvre par quatre valves. Nous avons travaillé sur *Datura stramonium*, *Datura tatula*, *Datura inermis*, *Datura metel*, *Datura inoxia*.

Datura stramonium L. (2 n = 24)

Datura stramonium est une herbe annuelle presque glabre. Elle peut atteindre 1,20 m de hauteur. Les feuilles sont ovales, pétiolées et pointues à l'extrémité. Les fleurs, solitaires, sont dressées. Elles ont une corolle blanche infundibuliforme terminée par cinq lobes. Le fruit est une capsule dressée recouverte d'épines rudes, qui s'ouvre par quatre valves régulières. Il renferme des graines noires, réniformes, à tégument réticulé.

Datura tatula L. = *Datura stramonium* L. var. *purpurascens*
(2n = 24) Hoffmseg et Link.

= *Datura stramonium* L. var. *tatula* D.C.

= *Datura stramonium* var. *chalibeae* Koch

Datura metel L.

Datura tatula est considéré par Linné comme une espèce différente de *Datura stramonium*. Pour la plupart des systématiciens, elle n'est qu'une variété de *Datura stramonium*. *Datura tatula* L. possède des tiges violet foncé parsemées de taches vertes. Le calice, la corolle et les nervures des feuilles sont également de teinte violette.

Datura inermis Jacq. = *Datura levis* L.

Datura inermis est considéré comme une variété de *Datura stramonium* L. Il se caractérise par ses capsules non épineuses.

Datura metel L. = *Datura fastuosa* L.

Datura metel est une plante annuelle de 40 centimètres à 1 mètre de hauteur. Les feuilles sont glabres, ovales, entières. Les fleurs, blanches ou rosées, sont plus grandes que celles de *Datura stramonium*. Les capsules portent de courtes épines; elles sont pendantes et s'ouvrent par quatre valves irrégulières. Les graines réniformes et aplaties ont des téguments brun clair

Datura innoxia Mill.

Datura innoxia Mill. a été longtemps confondu avec *Datura metel* L. Il est pubescent. Sa corolle blanche est de grande taille; elle se termine par dix dents. Le fruit est une capsule couverte de très longues épines; il s'ouvre par quatre valves irrégulières. Les graines sont brunes.

- Le genre *Hyoscyamus*

Le genre *Hyoscyamus* comprend des herbes annuelles ou vivaces à feuilles alternes simples. Les fleurs présentent un calice urcéolé terminé par cinq dents, une corolle infundibuliforme souvent fendue latéralement. Cette corolle est blanche, jaune ou veinée de violet; elle se termine par cinq lobes. Le fruit est une pyxide incluse dans le calice accrescent. Les graines sont réniformes ou orbiculaires.

Datura inermis Jacq.

Nous avons travaillé sur *Hyoscyamus niger* L., *Hyoscyamus albus* L. et l'hybride *Hyoscyamus niger* x *Hyoscyamus albus*.

Hyoscyamus niger L. (2 n = 34)

La Jusquiame noire est une plante herbacée à tige velue et visqueuse. Les feuilles caulinaires sont sessiles et amplexicaules. Les feuilles sont très velues. Les fleurs groupées d'un même côté en une grappe courte ont un calice velu à cinq lobes, une corolle légèrement zygomorphe, jaune pâle, veinée de pourpre et de violet à la gorge. Le fruit est une pyxide entourée par le calice persistant. Les graines sont très petites (1 mm) et possèdent un tégument brun grisâtre, chagriné et réticulé.

La plante renferme de la scopolamine et de l'hyoscyamine.

Hyoscyamus albus L. (2 n = 68)

La Jusquiame blanche que nous avons étudiée appartient à la variété annuelle. C'est une plante très velue, à feuilles pétiolées et à dents triangulaires. Les fleurs possèdent une corolle jaune blanchâtre, non veinée, avec une gorge verdâtre. Cette corolle est nettement zygomorphe. Le fruit est une pyxide peu renflée à la base.

L'alcaloïde principal de la Jusquiame blanche est la scopolamine

Hyoscyamus niger x *Hyoscyamus albus*

Il s'agit d'un hybride fertile amphidiploïde obtenu par B. GYORFFY et G. MELCHERS (82). Nous cultivons depuis deux ans cet hybride au Jardin Botanique de la Faculté de Pharmacie de Lyon et avons travaillé sur les graines que nous avons récoltées.

Morphologiquement cet hybride est très proche de *Hyoscyamus niger* en particulier par ses feuilles velues et la faible zygomorphie de sa fleur dont la corolle est jaune avec une gorge violet sombre.

Scopolia stramonifolia Wall. = *Scopolia lurida* Link. =
Anisodus luridus L.

Scopolia stramonifolia est originaire de l'Himalaya. C'est une grande plante herbacée pouvant atteindre plus de deux mètres de hauteur. La racine souvent tordue présente parfois un aspect anthropomorphe. Les feuilles sont alternes, pétiolées et oblongues. Les fleurs sont isolées. Le calice, porteur de cinq dents, est pubescent; il reste accrescent autour du fruit. La corolle campanulée est pubescente et de coloration jaune-vert pâle; elle possède cinq languettes violettes recourbées vers l'extérieur. Le fruit est une capsule presque ronde. Les graines sont marron, réniformes, plates, avec une surface tachée de points bruns.

Hyoscyamus niger x *Hyoscyamus albus*

3.4. Préparation des extraits de graines pour l'électrofocalisation sur colonne

Les graines sont traitées une douzaine d'heures au Soxhlet par l'éther de pétrole. Les graines délipidées sont ensuite broyées au Warring Blender à vitesse lente pendant 5 minutes.

Selon les indications données par GRELLET et MILHOMME (60) les protéines sont extraites à l'aide du tampon suivant :

Tris chlorhydrique (pH = 7,8)	0,05 M	TRIS 0,2 N : 25 ml eau qsp
		HCl 0,2 N : 16,3 ml 168 ml
Saccharose	0,4 M	22,7 g
Chlorure de magnésium	0,002M	0,335 g
Chlorure de calcium	0,001M	0,222 g
Mercapto éthanol	0,004M	1,052 g

La présence d'un réducteur comme le mercapto éthanol est indispensable pour empêcher l'oxydation des polyphénols et leur polymérisation comme nous l'avons déjà signalé. Ces polymères se combinent aisément avec les protéines et perturbent les dosages préalables.

- Après décantation, le résidu est repris par 20 ml de tampon. Cette opération est répétée trois fois.

- Nous vérifions au microscope la disparition de toute structure cellulaire. Un broyage complémentaire au mortier en présence de sable de Fontainebleau ne s'est pas avéré nécessaire.

- Le liquide d'extraction après filtration sur gaze, est centrifugé trente minutes à 10.500 G puis une heure à 105.000 G en centrifugeuse réfrigérée.

- Les surnageants sont ensuite purifiés selon les indications de VAN LOON et VAN KAMMEN (132). Nous avons personnellement constaté qu'il est souhaitable d'effectuer une deuxième chromatographie sur une colonne de Séphadex G 200, à 4°. La vitesse d'écoulement du tampon Tris chlorhydrique est d'environ 15 gouttes par minute pour des tubulures de 2 mm.

En sortie de colonne, nous avons concentré l'effluent par passage sur un concentrateur d'éluat Diaflo muni d'une membrane U.M. 10.

3.5. La préparation des extraits de graines pour l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide

La présence de polyphénols dans les extraits végétaux est une difficulté importante pour réaliser une électrofocalisation. Cette difficulté déjà sensible pour l'électrofocalisation sur colonne devient très grande dans le cas de l'électrofocalisation sur couche mince. En effet les effets de polymérisation rendent délicate la lecture des protéinogrammes.

Les graines des Solanacées étudiées, notamment celle d'*Atropa belladonna*, contiennent d'importantes quantités de polyphénols. L'expérience nous a montré que l'addition du dithiothréitol dans le tampon d'extraction, suivi d'une précipitation par la polyvinylpyrrolidone insoluble permet d'obtenir des protéinogrammes beaucoup plus clairs. Le protocole que nous avons mis au point est le suivant :

10 g de graines préalablement délipidées par l'éther de pétrole sont broyées dix minutes dans un Waring Blender en présence de 200 ml de tampon TRIS chlorhydrique à pH 7,5. Ce tampon contient du dithiothréitol à la concentration de 0,5 m M et 20 g de polyvinylpyrrolidone insoluble. Après filtration sur gaze, nous centrifugeons l'extrait 30 minutes à 15.000 G, puis une heure à 105.000 G en centrifugeuse réfrigérée à 4°C.

Nous concentrons ensuite le surnageant par dialyse en boyaux contre un tampon glycolle de façon à obtenir un volume de 2 ml.

Les extraits concentrés peuvent être conservés au congélateur, toutefois il est préférable de procéder à la focalisation dans la semaine qui suit leur préparation.

3.6 Comparaison de cinq espèces du genre *Datura* par électrofocalisation sur colonne

3.6.1 Les résultats obtenus

Nous avons comparé en électrofocalisation sur colonne 5 espèces du genre *Datura*.

Nous avons utilisé la gamme d'ampholines assurant le gradient de pH compris entre 3 et 11.

Nous avons regroupé ces résultats dans les tableaux^o n°7 et n° 8 et les diagrammes d'électrofocalisation sur les figures n°36,37,38,39,40.

3.6.2 Discussion des résultats

Datura stramonium et Datura tatula: (figures 36 et 37)

Les fractions protéiques de *Datura stramonium* et de *Datura tatula* sont localisées dans une zone relativement acide comprise entre les pH 5,2 et pH 7,7. Ces fractions sont au nombre de 10 chez *Datura stramonium* et de 9 chez *Datura tatula*. Les points isoélectriques de ces protéines sont identiques si nous exceptons une fraction à pH 6,3 appartenant à *Datura tatula* et deux fractions à pH 7,2 et 7,5 appartenant à *Datura stramonium*. L'identité des fractions protéiques de ces *Datura* s'avère donc très nette.

Datura inermis (figure n° 38)

Les fractions protéiques de *Datura inermis* sont localisées entre pH 6,8 et pH 9,4. Nous avons pu situer six de ces fractions au voisinage de la neutralité entre pH 6,8 et pH 6,2.

- Deux fractions dans la zone faiblement alcaline : pH 7,6 et pH 7,7
- Quatre fractions dans la zone nettement alcaline comportant un groupe entre pH 8,1 et pH 8,3 et un groupe entre pH 9,2 et pH 9,4

Datura inermis se caractérise par la répartition de ses fractions protéiques en trois groupes; l'un d'entre eux est situé dans la zone alcaline des pH.

Fractions obtenues par électrofocalisation
sur colonne des extraits protéiques de
graines de divers *Datura* sur colonne d'ampholines

Tableau n° 7

pH	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura tatula</i>	<i>Datura inermis</i>	<i>Datura metel</i>	<i>Datura innoxia</i>
3,3					+
3,5					+
3,8					+
3,9					+
4					+
4,1					+
4,3					+
4,5					+
4,8					+
5,2	+	+			
5,3					+
5,5	+	+			
5,6	+	+			
5,8					+
6,1					+
6,2	+	+			
6,3		+			
6,4	+	+		+	
6,7	+	+	+		
6,8			+		
6,9			+	+	+

Tableau n° 8

pH	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura tatula</i>	<i>Datura inermis</i>	<i>Datura metel</i>	<i>Datura innoxia</i>
7			+	+	
7,1			+		
7,2	+		+		
7,3					+
7,4				+	
7,5	+			+	
7,6	+	+	+		
7,7	+	+	+		
7,9				+	
8,1			+	+	
8,2				+	
8,3			+		+
8,6				+	
8,7				+	+
8,8				+	
8,9				+	
9,2			+	+	
9,4			+		
9,5				+	
10,4				+	
10,7				+	
10,9				+	

D A T U R A S T R A M O N I U M

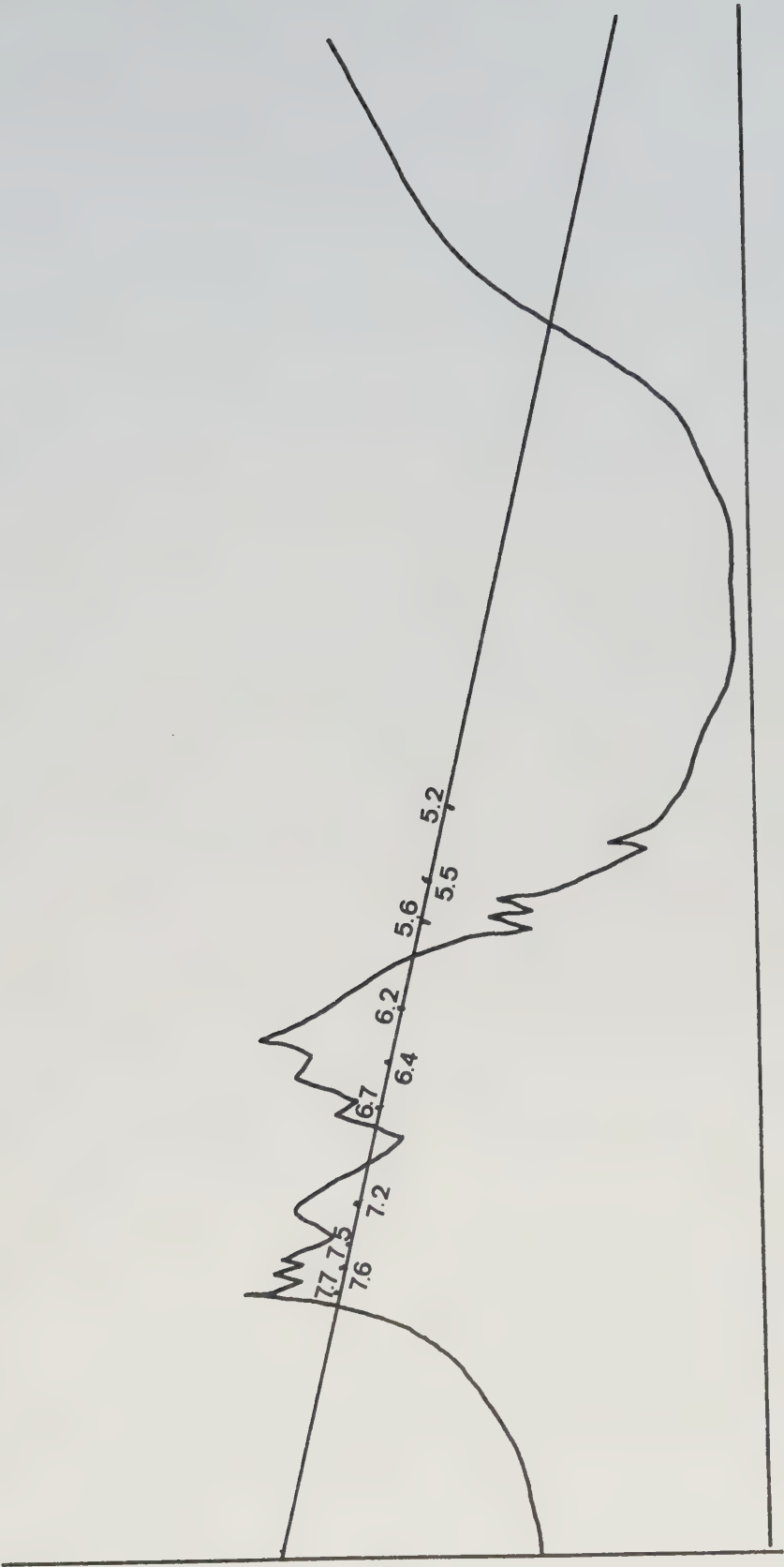


Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

D A T U R A T A T U L A

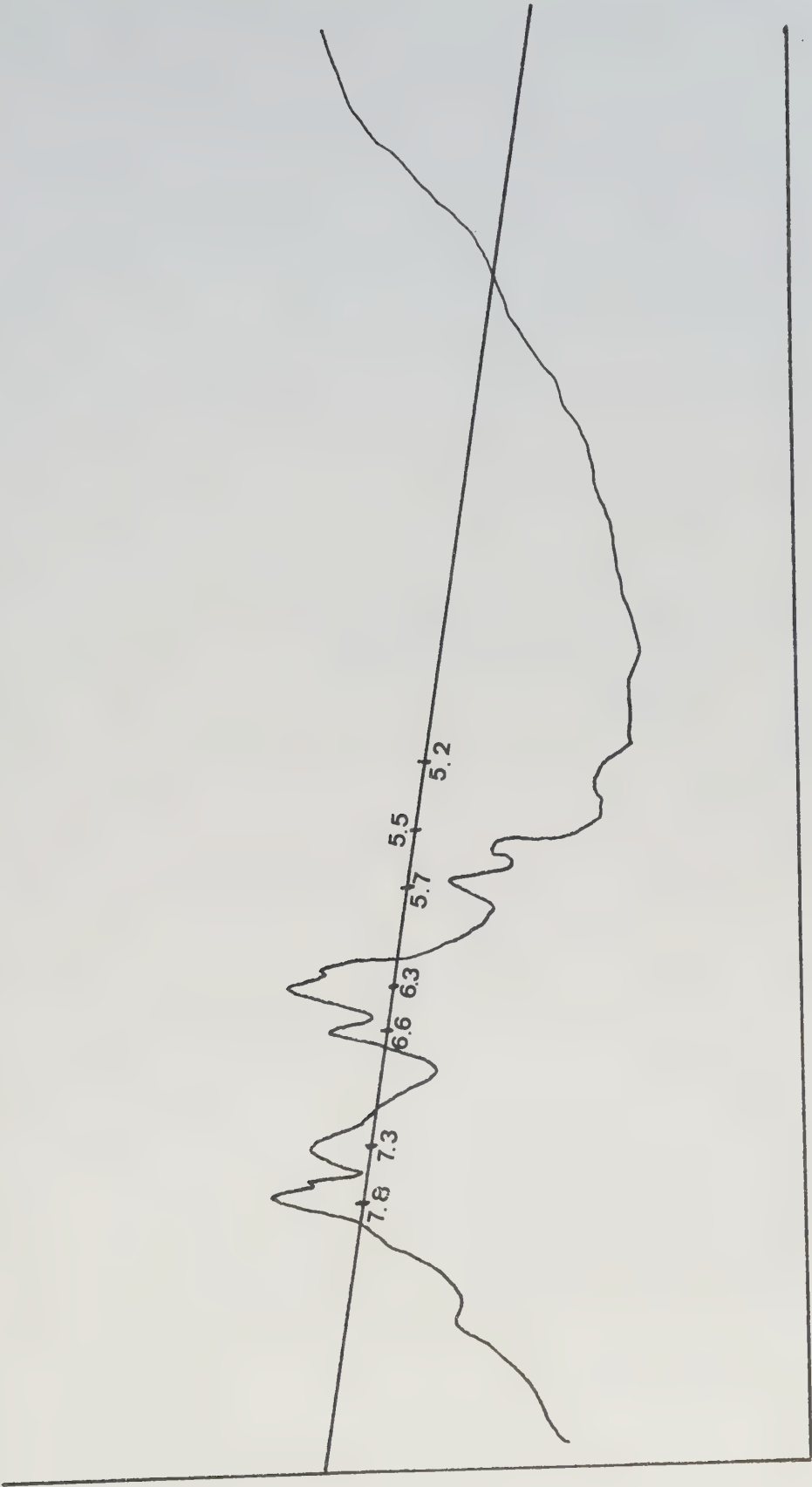


Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

D A T U R A I N E R M I S

Figure 38

Datura inermis

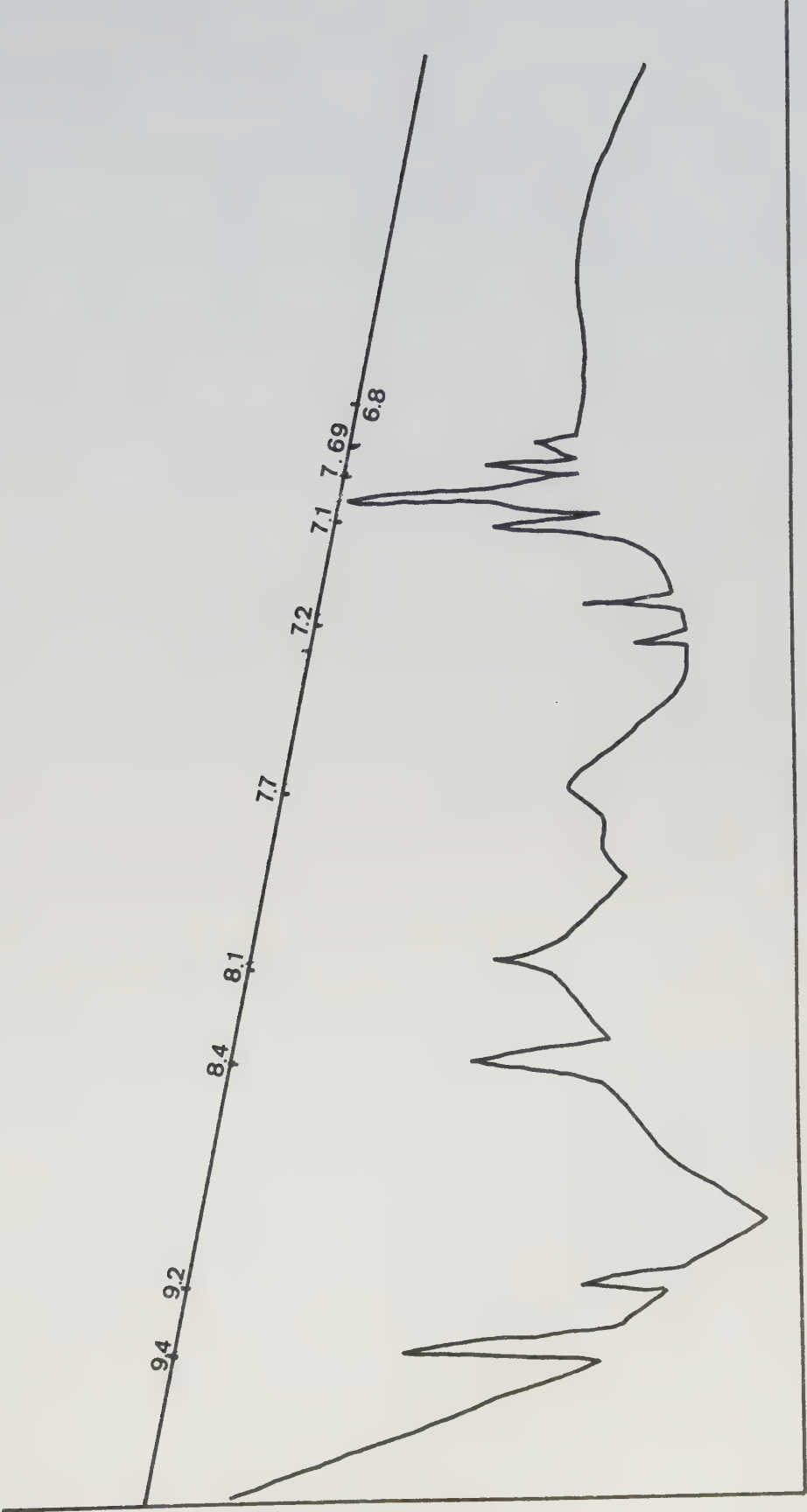


Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

D A T U R A M E T E L

Figure 39

Datura metal

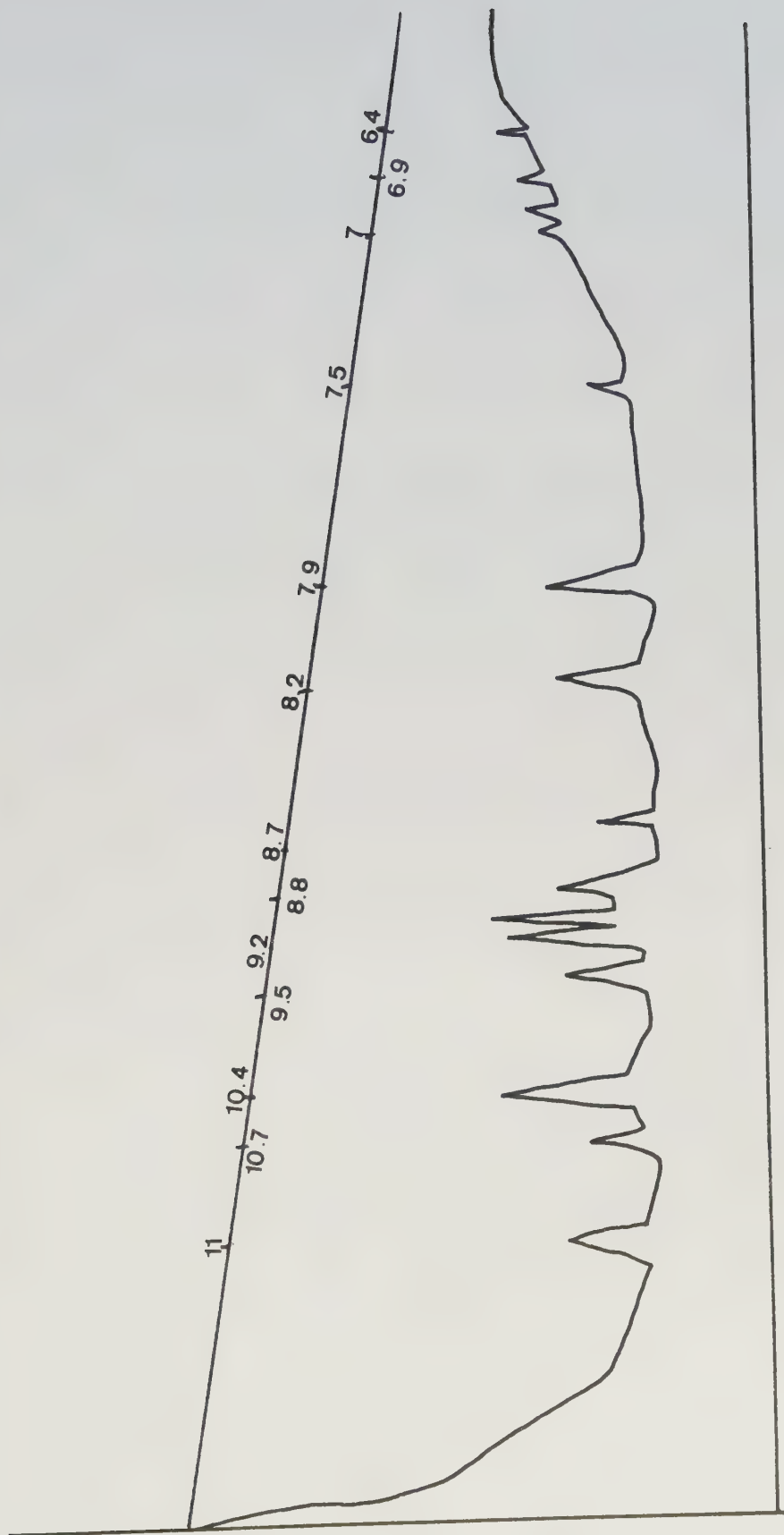


Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

D A T U R A . . . I N ~~N~~ O X I A

Figure 40

Datura innoxia



Diagramme d'électrofocalisation sur colonne

Datura metel : (figure 39)

Les fractions protéiques de *Datura metel* sont réparties entre pH 6,4 et pH 11. Nous avons noté :

- Une seule fraction en zone acide, vers pH 6,4.
- Quatre fractions dans la zone proche de la neutralité entre pH 6,9 et pH 7,5
- Huit fractions dans la zone alcaline entre pH 7,9 et pH 9,2
- Quatre fractions dans la zone très alcaline, entre pH 9,5 et pH 11.

Les fractions protéiques de *Datura metel* se répartissent donc en quatre groupes. L'un de ces groupes est situé dans une zone fortement alcaline. La présence de huit fractions entre pH 7,9 et pH 9,2 rapproche le *Datura metel* de *Datura inermis*.

Datura innoxia : (figure 40)

Datura innoxia est l'espèce qui a fourni le plus grand nombre de fractions : 18. Ces dix huit fractions localisées entre pH 3,3 et pH 8,6 se répartissent ainsi :

- Neuf fractions dans la zone nettement acide, entre pH 3,3 et pH 4,8
- Cinq fractions dans la zone moyennement acide entre pH 5,5 et pH 6,7
- Deux fractions dans la zone proche de la neutralité entre pH 6,9 et pH 7,2.
- Deux fractions dans la zone alcaline vers pH 8,3 et pH 8,7.

Datura innoxia se distingue nettement des autres *Datura* que nous avons étudiés par la présence de huit fractions dans la zone acide des pH.

Les fractions homologues aux cinq *Datura* étudiés :

Les fractions protéiques caractérisant les cinq *Datura* que nous avons étudiés ont été regroupés dans le tableau n° 9 . Elles ont été comptées à l'intérieur d'intervalles correspondant à une unité pH. Nous constatons aussi que les fractions protéiques communes aux cinq espèces de *Datura* se trouvent groupées entre pH 6 et pH 8. Nous avons repéré dans cette zone :

- 7 bandes pour *Datura stramonium*
- 6 bandes pour *Datura tatula*
- 8 bandes pour *Datura inermis*
- 6 bandes pour *Datura metel*
- 6 bandes pour *Datura innoxia*

Ce groupe de fractions nous était déjà apparu sous forme d'un bloc commun à tous les *Datura* étudiés lors d'essais préliminaires effectués en électrophorèse simple sur gel. Il semble donc caractéristique du genre *Datura*.

Tableau n° 9

Intervalles de pH	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura tatula</i>	<i>Datura inermis</i>	<i>Datura metel</i>	<i>Datura innoxia</i>
3 à 4	-	-	-	-	5
4 à 5	-	-	-	-	4
5 à 6	3	3	-	-	1
6 à 7	3	4	4	3	5
7 à 8	4	2	4	3	1
8 à 9	-	-	2	6	2
9 à 10	-	-	2	2	-
10 à 11	-	-	-	3	-
Total des fractions	10	9	12	17	18

3.7. Comparaison de cinq espèces du genre *Datura* par l'électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide : les précisions apportées par cette méthode

3.7.1 Les résultats obtenus

Nous avons effectué l'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide dans les conditions définies dans le chapitre consacré aux techniques générales. La gamme de pH assuré par les ampholines s'étale de pH 3 à pH 11. Nos résultats ont été regroupés dans le tableau n° 10. Les protéinogrammes des cinq espèces de *Datura* ont été représentés sur les schémas n° 41 et 42.

Tableau n° 10

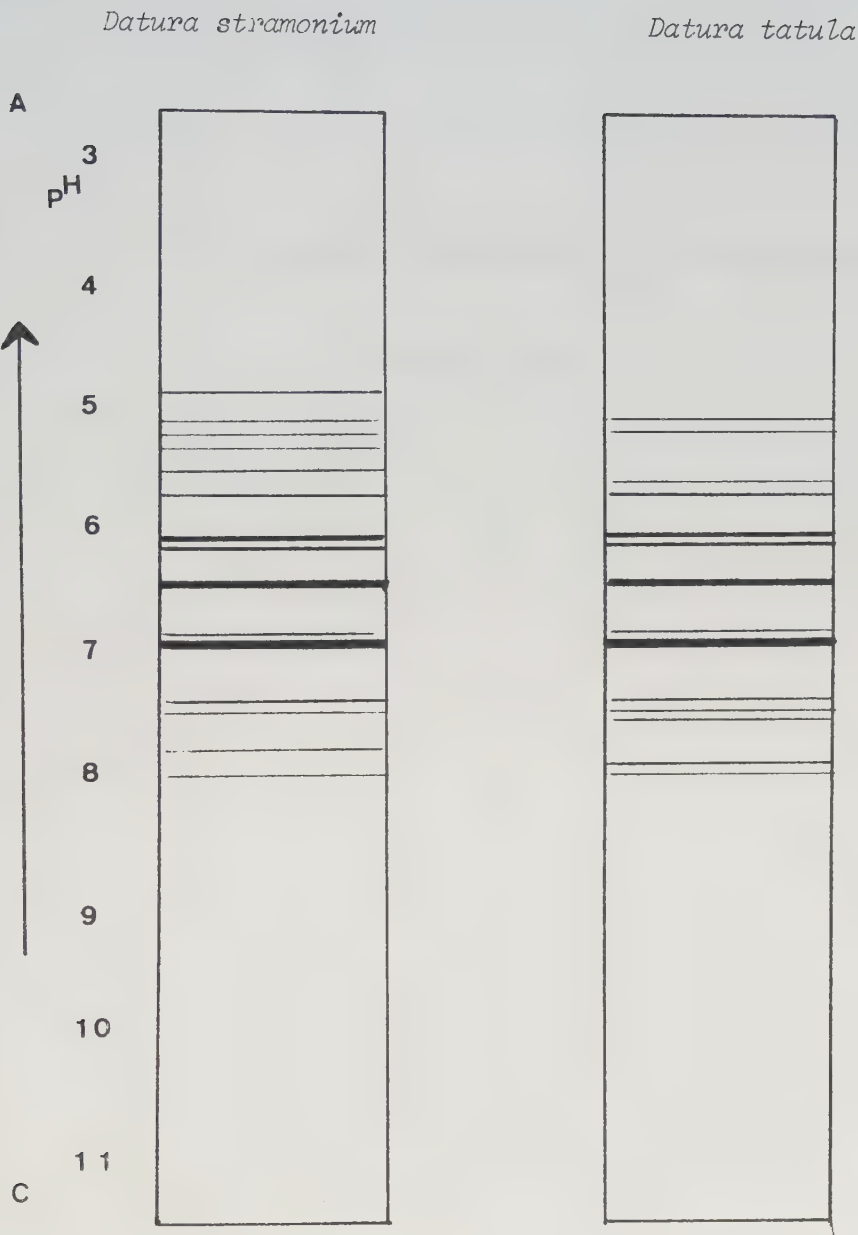
Principales bandes de focalisation sur couche mince de polyacrylamide

pH	<i>Datura stramonium</i>	<i>Datura tatula</i>	<i>Datura inermis</i>	<i>Datura metel</i>	<i>Datura innoxia</i>
3 - 4	-	-	-	-	8
4 - 5	-	-	-	-	2
5 - 6	6	4	-	-	-
6 - 7	5	5	5	5	5
7 - 8	4	5	4	2	2
8 - 9	-	-	-	-	3
9 - 10	-	-	7	2	-
10 - 11	-	-	-	8	-
Nombre total de bandes	15	14	16	17	20

Datura stramonium et *Datura tatula*

Protéinogrammes

Figure 41



Datura inermis, *Datura metel* et *Datura innoxia*

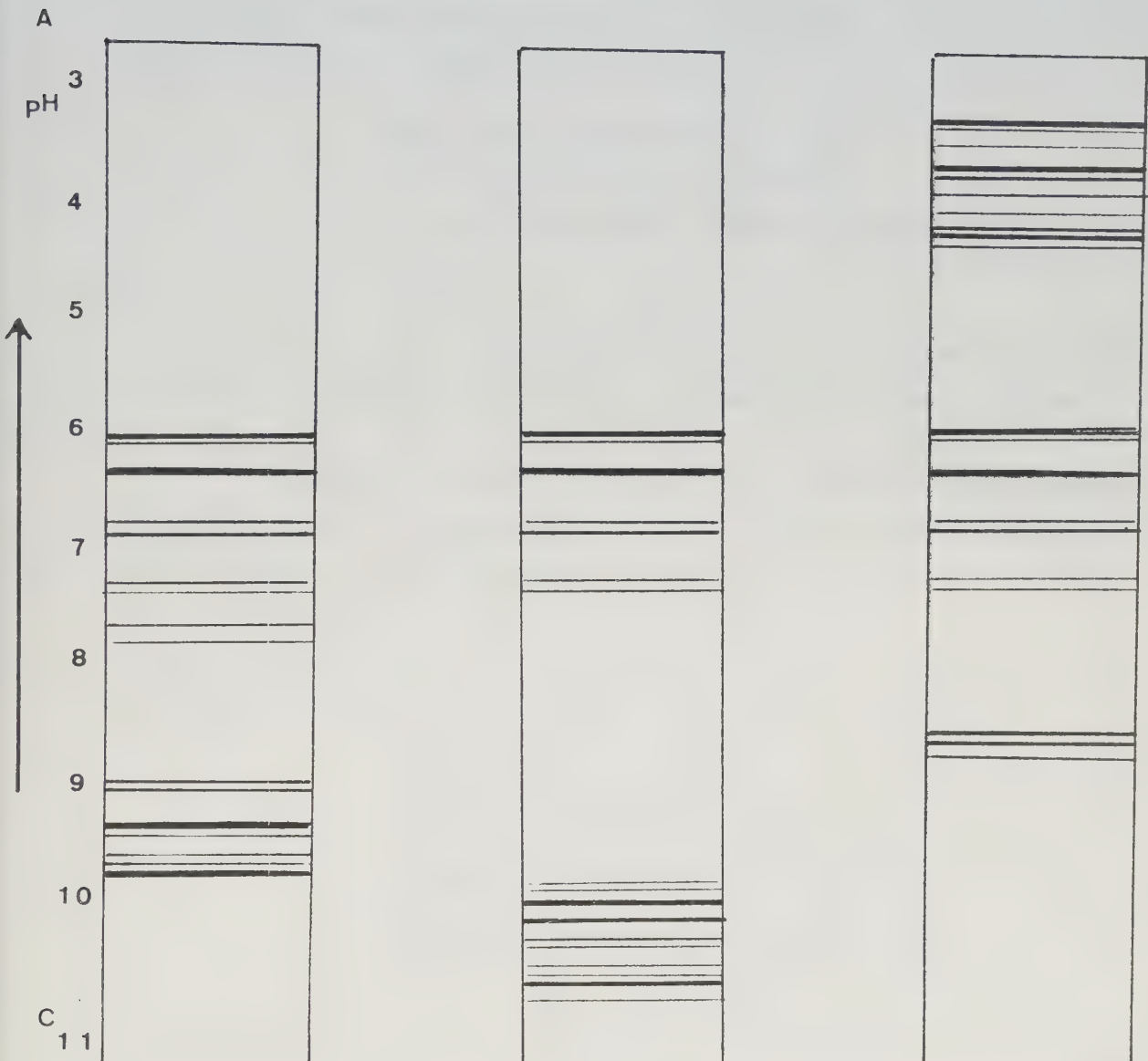
Protéinogrammes

Figure 42

Datura inermis

Datura metel

Datura innoxia



3.7.2 Discussion des résultats

L'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide confirme en les précisant les résultats obtenus par électrofocalisation sur colonne.

- Les bandes protéiques de *Datura stramonium* et de *Datura metel* se trouvent situées entre pH 5 et pH 8,2. Entre pH 6 et pH 7, nous avons noté les bandes les plus nettes, il s'agit de :

- . deux bandes importantes vers pH 6
- . une bande importante vers pH 6,4
- . une bande importante, doublée d'une bande plus mince vers pH 7.

Ces bandes se retrouvent chez les quatre autres *Datura* étudiés, les légères différences observées ne portent que sur leur épaisseur.

Datura stramonium et *Datura tatula* ont des protéinogrammes à peu près identiques; ils ne diffèrent que par un décalage peu important de leurs bandes minces situées entre pH 5 et pH 5,8.

- Les bandes protéiques de *Datura inermis* sont localisées entre pH 6 et pH 10. Nous avons distingué trois groupes comprenant :

- . quatre bandes importantes entre pH 6 et pH 7 : ce groupe se retrouve aussi chez *Datura stramonium*
- . des bandes plus minces entre pH 7,5 et pH 7,8
- . sept bandes de situation catodique comprenant :
 - deux bandes importantes vers pH 9
 - une bande importante doublée d'une bande mince vers pH 9,6
 - une bande très importante vers pH 10.

Ces faits confirment la répartition en trois groupes du diagramme de focalisation sur colonne d'ampholines.

Le protéinogramme de *Datura metel* révèle des bandes localisées entre pH 6 et pH 11. Il se caractérise par :

- . la présence des quatre bandes importantes comprises entre pH 6 et pH 7 déjà rencontrées dans les protéinogrammes précédents
- . deux bandes fines vers pH 7,5
- . une dizaine de bandes de situation catodique situées entre pH 10 et pH 11. Nous pouvons remarquer parmi elles deux bandes très importantes vers pH 10,2. et une bande importante doublée d'une bande fine vers pH 10,8.

La situation catodique de ces dernières bandes rapproche *Datura metel* de *Datura inermis*. Mais les bandes sont plus nombreuses et encore davantage catodique chez *Datura metel*.

- Les bandes protéiques de *Datura innoxia* sont localisées entre pH 3 et pH 9. Nous avons remarqué sur ce protéinogramme :

- . un groupe de localisation franchement anodique entre pH 3 et pH 4,2 comportant une dizaine de bandes. Quatre d'entre elles sont très importantes, elles se situent vers pH 3,2, pH 3,4 et pH 4.
- . un groupe entre pH 6 et pH 7 constitué par quatre bandes importantes
- . un groupe vers pH 8,6 comportant deux bandes très importantes.

Le protéinogramme de *Datura innoxia* est donc le seul à comporter un nombre élevé de bandes dans la région anodique.

- Chez les cinq *Datura* étudiés nous avons retrouvé un certain nombre de fractions homologues. Ces dernières apparaissent dans le tableau n° 10 et sont comprises entre pH 6 et pH 8. Les bandes situées entre pH 6 et pH 7

semblent les plus significatives. Nous les retrouvons en effet sur les protéinogrammes de tous les *Datura* étudiés sous forme d'un ensemble de cinq bandes : quatre d'entre elles sont particulièrement importantes. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce groupe de bandes est caractéristique du genre *Datura*.

3.8. Détermination des acides aminés libres des graines de quatre espèces du genre *Datura* : Comparaison des résultats

3.8.1 Extraction

Les graines, préalablement délipidées à l'éther de pétrole, ont été broyées en présence de tampon phosphate à pH 7,5. Nous avons employé 10 g de graines pour 100 ml de tampon, puis nous avons concentré sous pression réduite jusqu'à obtention de 10 ml d'extrait.

3.8.2 Dosage

Le dosage a été effectué dans les mêmes conditions que lors de l'étude des acides aminés libres dans les mycéliums de Pézizales.

3.8.3 Résultats

Nos résultats sont réunis dans le tableau n° 11 . Nous n'avons pu figurer dans ce tableau les acides aminés libres des graines de *Datura inermis* car nous ne disposions pas pour l'étude des protéines de quantités suffisantes en graines.

3.8.4 Comparaison des résultats

Les teneurs en azote aminé des graines de *Datura stramonium* (0,78 micromole/litre) et de *Datura tatula* (0,82 micromole/litre) s'avèrent

très proches; elles sont nettement plus faibles que celles de *Datura innoxia* et *Datura metel*.

- Les graines des quatre espèces de *Datura* étudiées ont en commun 13 acides aminés libres.

- *Datura stramonium* et *Datura metel* se caractérisent par :

- . l'absence d'ornithine, de lysine, d'arginine et d'histidine
- . leur faible teneur en sérine, acide glutamique, glycolle et cystéine.

Ces deux espèces ne diffèrent que par l'absence de glutamine chez *Datura stramonium*.

- *Datura metel* se distingue par sa forte teneur en glutamine : 13 micromole/litre et par l'absence de cystéine. Comme *Datura stramonium* et *Datura tatula* il ne possède pas d'ornithine, de lysine et d'histidine.

- *Datura innoxia* se caractérise par :

- . sa forte teneur en azote aminé : 1,56 micromole/litre
- . l'absence de proline
- . une teneur élevée en cystéine
- . la présence d'ornithine, de lysine et d'histidine.

Ces acides aminés sont absents chez les trois *Datura* étudiés

- . une teneur élevée en arginine : 120 micromole /litre.

Datura metel n'en possède que 37 micromole/litre. Cet acide amine est absent chez les graines de *Datura stramonium* et *Datura tatula*

En conclusion nous dirons que l'étude des acides aminés libres confirme l'analogie de *Datura stramonium* et de *Datura tatula*. La présence en forte concentration d'acides aminés basiques : ornithine, lysine, histidine, arginine distingue nettement *Datura innoxia* des trois autres espèces.

Tableau n° 11

ACIDES AMINES LIBRES DES GRAINES DE QUATRE *DATURA*

(les résultats sont exprimés en micromole / litre)

	<u><i>Datura</i> <i>stramonium</i></u>	<u><i>Datura</i> <i>tatula</i></u>	<u><i>Datura</i> <i>metel</i></u>	<u><i>Datura</i> <i>innoxia</i></u>
Azote aminé	0,78	0,82	1,06	1,56
Acide aspartique	70	92	252	254
Thréonine	11	9	43	142
Sérine	16	50	71	199
Asparagine	108	82	189	168
Acide glutamique	44	61	151	82
Glutamine	0	3	13	0
Proline	58	50	42	0
Glycocolle	9	6	49	33
Alanine	16	32	94	287
Valine	26	21	42	69
Cystéine	2	4	0	41
Méthionine	7	8	7	3
Isoleucine	12	15	11	23
Leucine	13	18	25	52
Tyrosine	7	11	9	16
Phénylalanine	18	23	15	27
Ornithine	0	0	0	20
Lysine	0	0	0	25
Histidine	0	0	0	10
Arginine	0	0	37	120

Datura metel s'avère plus proche de *Datura stramonium* et de *Datura tatula*, il s'en distingue par l'absence de cystéine et par ses teneurs élevées en asparagine et en acide glutamique.

3.9. Comparaison de six Solanacées par électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide

Les extraits protéiques des graines de *Datura stramonium*, *Atropa belladonna*, *Scopolia stramonifolia*, *Hyoscyamus niger*, *Hyoscyamus albus* et de l'hybride *Hyoscyamus niger* x *Hyoscyamus albus* ont été étudiés; La simplicité d'emploi et la finesse résolutive de l'électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide nous font préférer cette technique à l'électrofocalisation sur colonne d'ampholine. La gamme de pH assurée par les ampholines va de 3 à 11.

3.9.1 Résultats obtenus

Nos résultats sont regroupés dans le tableau n°12 . Les protéogrammes de ces différentes espèces sont schématisés sur les figures n°43 et 44

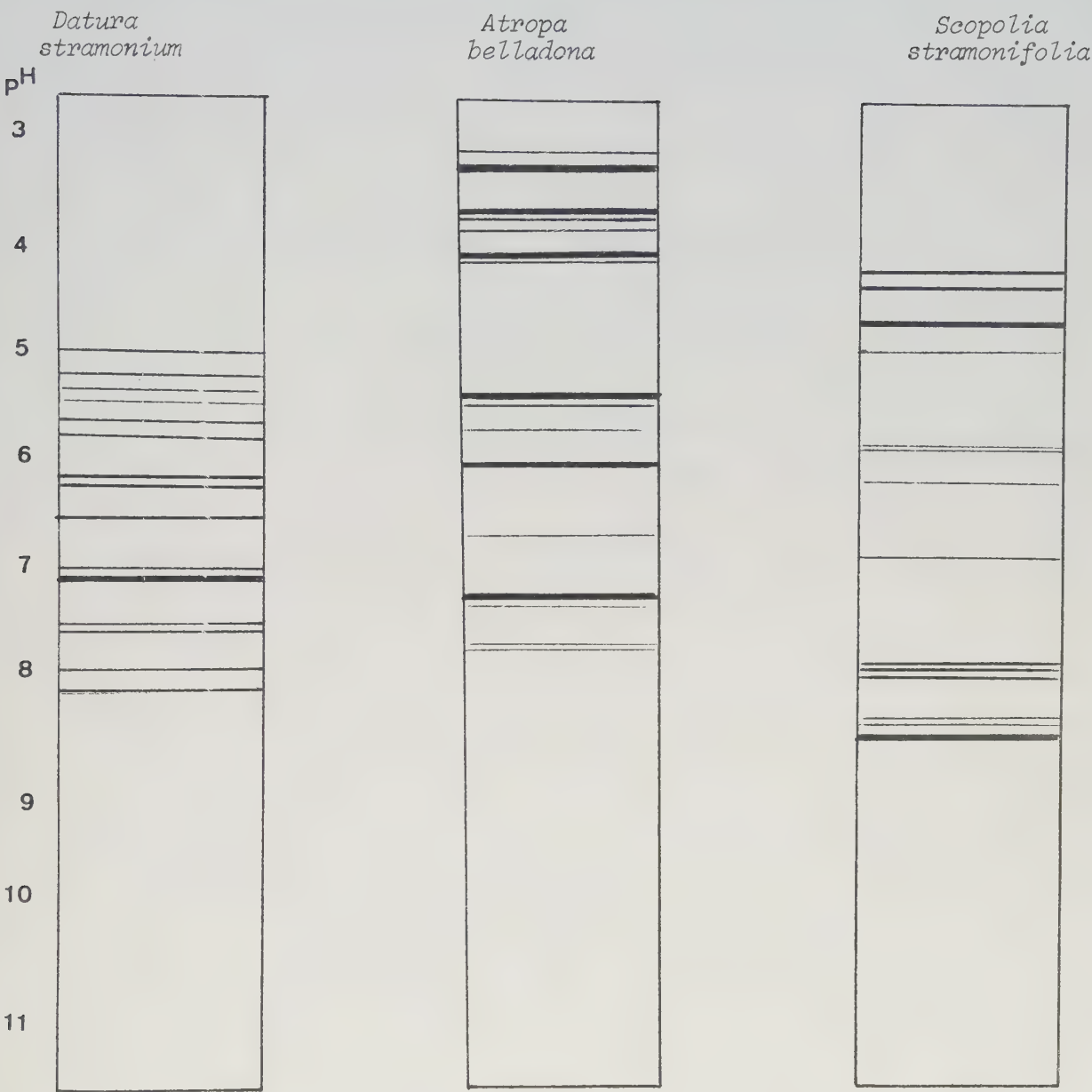
Tableau n° 12
Principales bandes de focalisation sur couche mince

pH	<i>Datura stramonium</i>	<i>Atropa belladonna</i>	<i>Scopolia stramonifolia</i>	<i>Hyoscyamus niger</i>	<i>Hyoscyamus niger</i> x <i>H. albus</i>	<i>Hyoscyamus albus</i>
3 - 4	-	7	-	1	2	1
4 - 5	-	-	4	3	2	2
5 - 6	6	4	3	2	3	1
6 - 7	5	1	1	-	1	-
7 - 8	4	4	6	3	3	3
8 - 9	-	-	-	2	2	-
9 -10	-	-	-	2	2	4
10 -11	-	-	-	2	2	1
Nombre total de bandes	15	16	14	15	17	12

DATURA STRAMONIUM, ATROPA BELLADONA et
SCOPOLIA STRAMONIFOLIA

Protéinogrammes

Figure 43

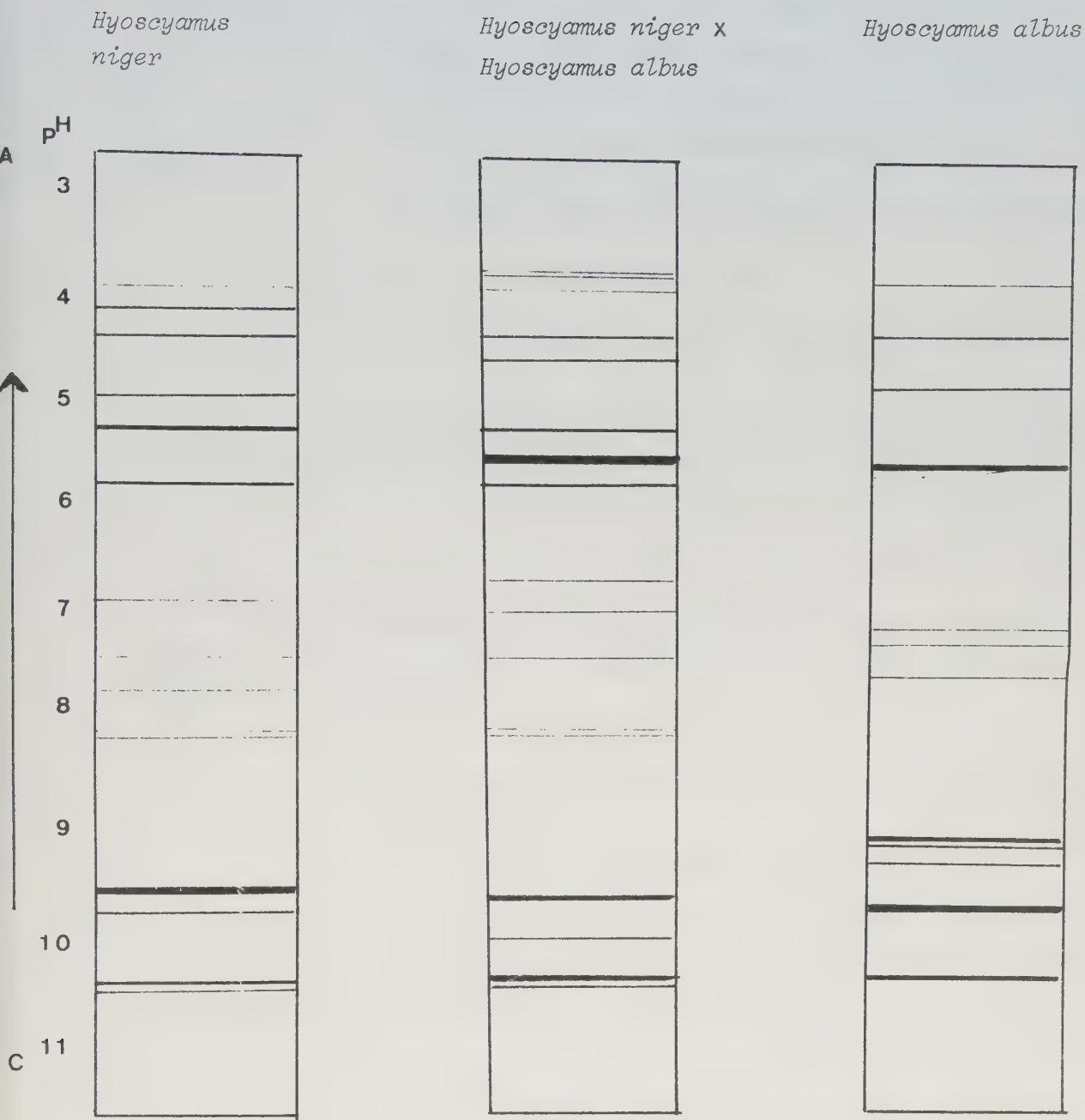


HYOSCYAMUS NIGER, *HYOSCYAMUS ALBUS* et

HYOSCYAMUS NIGER x *HYOSCYAMUS ALBUS*

Protéinogrammes

Figure 44



3.9.2 Discussion des résultats

- Le protéinogramme des graines d'*Atropa belladonna* possède des bandes comprises entre pH = 3 et pH = 7,5. Il se caractérise par :

- . la présence de 7 bandes anodiques situées entre pH 3 et pH 4. Parmi elles nous avons noté une bande très importante vers pH 3,4 et deux bandes plus minces vers pH 4
- . une bande large à pH 5,2 doublée d'une bande très fine
- . une bande importante vers pH 6
- . une bande large vers pH 7,2 doublée d'une bande fine.

Atropa belladonna est la seule des six Solanacées examinées qui présente des bandes de situation anodique.

- Le protéinogramme des graines de *Scopolia stramonifolia* comporte environ 14 bandes localisées entre pH 4 et pH 8,5. Nous avons remarqué la présence de :

- . 4 bandes entre pH 4 et pH 4,8. Trois d'entre elles sont importantes
- . 4 bandes très fines entre pH 6 et pH 7
- . 6 bandes proches entre pH 8 et pH 8,5. Une seule est très nette. Cette dernière localisée à pH 8,5 n'apparaît chez aucune des autres Solanacées étudiées.

- Le protéinogramme des graines de *Hyoscyamus niger* comprend 15 bandes situées entre pH 3,8 et pH 11. Il se caractérise par :

- . 3 bandes fines vers pH 4
- . 1 bande large à pH 5,4
- . 5 bandes fines entre pH 7 et pH 8
- . 1 bande importante vers pH 9,8
- . 2 bandes fines vers pH 10,4.

- Le protéinogramme de *Hyoscyamus albus* ne possède que 12 bandes comprises entre pH 3,8 et pH. Nous avons noté parmi elles :

- . une bande très importante vers pH 5,8 possédant la même situation que celle trouvée chez la forme allopolyploïde
- . une bande large doublée d'une bande fine vers pH 9
- . une bande importante vers pH 9,8. Cette dernière est commune aux trois *Hyoscyamus* étudiés.

- Le protéinogramme de la variété allopolyploïde *Hyoscyamus niger* x *Hyoscyamus albus* comporte 17 bandes localisées entre pH 3,8 et pH 11.

La répartition générale des bandes s'avère voisine de celle observée pour *Hyoscyamus niger*. Nous noterons cependant une différence, il s'agit de la large bande située vers pH 5,8. Il nous semble qu'une bande de même position se retrouve chez *Hyoscyamus albus*.

4) CONCLUSION

=====

Pour les six *Datura* envisagés, nous avons constaté une excellente convergence entre les résultats obtenus grâce aux deux méthodes d'électrofocalisation et à l'étude des acides aminés libres.

Ces six *Datura* possèdent en commun quatre bandes comprises entre pH 6 et pH 7.

Après étude des protéinogrammes et des acides aminés libres, l'identité de *Datura stramonium* et de *Datura tatula* nous semble complète. Nous rejoignons ici les conclusions émises par Madame DEBELMAS (32). En effet, cet auteur a conclu, après une étude chromatographique des polyphénols et des alcaloïdes, à l'identité de ces deux espèces.

Ces faits ne justifient donc pas comme l'avait proposé Linné l'existence de deux espèces et apportent des arguments supplémentaires aux systématiciens qui ne faisaient de *Datura tatula* qu'une variété de *Datura stramonium*.

Datura inermis se caractérise essentiellement par des bandes de situation catodique. Nous avons noté notamment trois bandes importantes entre pH 9 et pH 10.

Le protéinogramme de *Datura metel* possède un nombre élevé de bandes de situation catodique, ce qui le rapproche de celui de *Datura inermis*. Mais ce *Datura* ne possède pas de cystéine libre et présente une teneur élevée en glutamine.

Pour le *Datura innoxia* qui pendant longtemps avait été confondu avec le *Datura metel* nous retiendrons surtout sur les protéinogrammes les bandes de situation très anodiques et la teneur élevée en acides aminés basiques.

Le protéinogramme d'*Atropa belladonna* diffère des cinq autres Solanacées par des bandes importantes de situation très anodiques.

Quant à *Scopolia stramonifolia* il possède un protéinogramme caractérisé par de larges bandes entre pH 4 et pH 4,8, et par de nombreuses bandes entre pH 8 et pH 8,6.

Chez les trois *Hyoscyamus* étudiés nous retrouvons sur les protéinogrammes quatre groupes de bandes protéiques situées vers pH 4, entre pH 5 et pH 6, entre pH 7 et pH 8, entre pH 9 et pH 10,8.

Nous avons particulièrement remarqué une large bande à pH 9,8 commune aux trois *Hyoscyamus*; les autres Solanacées étudiées ne la possèdent pas. Une autre bande commune aux *Hyoscyamus* est située vers pH 10,4.

La forme allopolyploïde (*Hyoscyamus niger* x *Hyoscyamus albus*) possède des bandes communes à *Hyoscyamus niger* et à *Hyoscyamus albus*, mais l'allure générale de son protéinogramme la rapproche davantage de *Hyoscyamus niger* que de *Hyoscyamus albus*. Ce fait a été confirmé lorsque nous avons observé la morphologie de cet hybride que nous avons cultivé au Jardin Botanique de notre Faculté.

CHAPITRE VI

APPLICATION DE L'ELECTRO-FOCALISATION
A LA GENETIQUE MOLECULAIRE :

ETUDE DE QUELQUES VARIANTS DE L' α_1

ANTI-TRYPSINE SERIQUE

Dès 1955, grâce à l'électrophorèse, SMITHIES (123) sur gel d'amidon, a mis en évidence la première allotypie en matière de protéines plasmatiques. En travaillant sur l'haptoglobine il a pu caractériser trois phénotypes usuels. Depuis de nouveaux groupes de protéines sériques ont été découverts et la complexité de ces groupes n'a cessé de croître.

Nous distinguerons selon la méthodologie employée :

. Les groupes sériques à définition immunologique : nous citerons par exemple les groupes d'immunoglobulines ou de beta-lipotrotéines.

. Les groupes sériques à définition électrophorétique : nous prendrons pour exemple les groupes d'haptoglobine, de transferrine, de céruloplasmine.

Parmi les groupes sériques à définition électrophorétique nous avons choisi un inhibiteur de protéases : l' α_1 anti-trypsin dont l'intérêt en pathologie moléculaire est de plus en plus reconnu.

1) LES INHIBITEURS DE PROTEASES

Les inhibiteurs de protéases ont été recensés dès 1968 par VOGEL et coll. (96) . Ils peuvent se rencontrer dans des groupes biologiques que rien ne relie entre eux : nous pensons au soja, à la pomme de terre, à l'ascaris, à divers mammifères. Ces inhibiteurs sont des protéines dont le poids moléculaire est compris entre 45.000 et 820.000.

Chez l'homme, ils ont été mis en évidence dans les tissus, les sécrétions et le sérum. Il convient de faire un bref historique. L'activité anti-trypsinique du sérum humain est connue depuis 1897, grâce aux travaux de CAMUS et GLEY. (18)

En 1900, LANDSTEINER a localisé l'activité anti-trypsique du sérum bovin dans la fraction sérum-albumine. (85)

En 1955, JACOBSSON (70) précise que pour 90 % ce pouvoir inhibiteur de protéase appartient à la fraction des α_1 globulines. Enfin six anti-protéases sériques ont été mises en évidence par SCHWICK^x et coll. Les plus importantes sont l' α_1 anti-trypsine et l' α_2 macroglobuline. Ces deux antitrypsines possèdent en effet la plus forte concentration sérique et le spectre d'action le plus étendu. (118)

L' α_1 anti-trypsine inhibe fortement la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et même une protéase fibrinolytique contenue dans des extraits d'*Aspergillus Orizae*. (92)

2) LES CARACTERES BIOCHIMIQUES DE L' α_1 ANTI-TRYPSINE

L' α_1 anti-trypsine (AT) est une glycoprotéine. La partie glucidique de cette molécule semble très variable qualitativement et quantitativement. Ce fait laisserait supposer que cette copule est responsable des variations biochimiques et même génétiques de cette glycoprotéine.

La partie peptidique a été étudiée par HEIMBURGER en 1971 (68) La chaîne peptidique semble unique. Cependant il se forme aisément des dimères lors de son isolement et de sa purification. Cette chaîne n'a pas encore fait l'objet d'une analyse de séquence.

L' α_1 antitrypsine agit après perte d'un fragment peptidique puis combinaison de la partie résiduelle avec la protéase qu'elle inhibe.

Un autre point mérite d'être signalé : l' α_1 anti trypsine est très sensible aux variations de température.

3) LES METHODES D'ETUDE DE L' α_1 ANTI TRYPSINE

Nous distinguerons parmi les méthodes d'étude de l' α_1 Anti-trypsine

- celles permettant de déterminer la concentration sérique de la protéine immunologiquement définie
- celles permettant la mesure de l'activité anti-protéasique
- celles permettant d'introduire son étude génétique.

3.1 Détermination de la concentration sérique en α_1 anti-trypsine

Nous avons utilisé pour cette détermination la méthode de MANCINI : il s'agit d'une immuno-diffusion radiale utilisant un sérum de lapin anti α_1 anti-trypsine monospécifique.

Les valeurs moyennes en α_1 anti-trypsine sérique sont d'environ 250 mg/100 ml.

Nous pouvons noter des variations physiologiques :

Le taux d' α_1 anti-trypsine est abaissé au moment de l'ovulation. Cette diminution est particulièrement nette dans la glaire cervicale (SCHUMACHER et PEARL) (114)

Le taux d' α_1 anti-trypsine est au contraire augmenté dans plusieurs cas :

- pendant la grossesse (GANROT et BJERRE) (54)
- lors des infections bactériennes
- après la vaccination anti-typhoïdique (KUEPPERS) (75)
- pendant la plupart des processus inflammatoires (WERNER et coll.) (139).

Ces variations posent le problème du rôle physiologique de l'inhibiteur. Nous ne pouvons faire actuellement que des hypothèses :

Plusieurs auteurs insistent sur le fait que l' α_1 anti-trypsine inhibe les protéases leucocytaires, notamment l'élastase des polynucléaires (KUEPPERS, BEARN, OHLSOSON) (78) . En effet les leucocytes ont une durée de vie relativement courte et représentent une masse cellulaire importante;

l' α_1 anti-trypsine pourrait assurer la protection de l'organisme contre les protéases libérées au moment de leur destruction. Nous verrons en fait que la pathologie fournira les meilleurs arguments, quant au rôle de cette α_1 anti-trypsine.

3.2. Détermination de l'activité anti-trypsique

Principe : La plupart des méthodes de détermination de l'activité anti-trypsique reposent sur l'hydrolyse trypsique d'un substrat synthétique. Il faut opérer d'une part en présence du sérum étudié, d'autre part en son absence; la molécule libérée est dosée par colorimétrie.

Pour une détermination rapide, la technique de JAMES et FUDENBERG (71) est suffisante :

Nous employons comme substrat de la gélatine photographique. Nous délimitons des cases sur une plaque de gélatine où nous déposons des solutions de concentration décroissante de trypsine. Nous ajoutons ensuite des quantités égales de sérum. La digestion de la gélatine par la trypsine se manifeste par l'apparition de taches blanches sur fond noir. Des sérums témoins permettent d'établir une courbe d'étalonnage.

Valeurs moyennes de l'activité anti trypsique : Ces valeurs s'expriment en mg de trypsine inhibée par 1 ml de sérum.

Les valeurs usuelles sont comprises entre 0,9 et 1,5 mg/ml.

Spécificité de la méthode : très faible. En effet nous apprécions une activité anti-trypsique totale, mais nous avons vu antérieurement que dans le sérum, 90 pour cent de cette activité étaient assurés par l' α_1 anti-trypsine.

3.3 Les méthodes d'électrophorèse

L'électrophorèse sur gels d'agar, la cross-électrophorèse, l'électrophorèse sur gels d'amidon, l'électrofocalisation ont permis l'étude de l' α_1 anti-trypsine sérique.

3.3.1 L'électrophorèse sur gels d'agar :

Cette méthode a été la première employée. Pour des pH compris entre 6 et 9, la protéine se manifeste sur les gels par une bande simple.

3.3.2 La cross-electrophorèse :

Grâce à cette technique LAURELL a montré que l'inhibiteur de certains sérums manifeste une migration plus lente. Toutefois il ne peut pas affirmer s'il s'agit d'une variation structurale ou de la formation d'un complexe avec une protéase. (86, 87, 88).

3.3.3. L'électrophorèse sur gels d'amidon :

Les gels d'amidon ont été utilisés par FAGHEROL (46) et KUEPPERS (77). Vers pH : 4,9 il a été possible d'identifier deux bandes principales suivies par deux bandes mineures.

3.3.4 L'électro-focalisation :

L'électrofocalisation est la méthode la plus employée actuellement par ARNAUD (7) et par ALLEN et coll. (2). CRAWFORD et coll. (28) utilisent cette technique pour le typage systématique de l'inhibiteur.

La concordance avec l'électrophorèse sur gel d'amidon acide est excellente; l'électrofocalisation présente en plus une commodité et une rapidité d'emploi bien supérieures. En effet la méthode de FAGHEROL, demande au moins un jour et demi de travail et la lisibilité des bandes est moins bonne.

ANDREUX et coll. (3) ont proposé quelques modifications techniques de détail. Ils préconisent l'emploi de gels mixtes de polyacrylamide et d'agarose, de tampons discontinus (créatine chlorhydrique, créatine acétique). Il ne semble pas que ces modifications apportent d'amélioration sensible par rapport à la technique sur gel d'amidon et surtout par rapport à la technique d'électro-focalisation que nous envisagerons ultérieurement.

3.4 Concordance des trois méthodes

Les trois méthodes que nous venons d'envisager ne sont pas nécessairement concordantes.

En effet, nous pouvons concevoir l'existence d'une α_1 anti-trypsine en quantité normale, mais phénotypiquement "variante" et présentant une activité anti-protéasique diminuée. Nous voyons bien sûr par cet exemple que ces trois méthodes sont complémentaires. Cependant il est parfois difficile de les mettre en oeuvre en même temps. Il faut alors adapter le protocole en fonction du but recherché.

Ainsi pour un diagnostic médical la recherche de la concentration sérique et la mesure de l'activité anti-trypsique auront priorité sur la détermination électrophorétique du phénotype qui ne sera effectuée que secondairement.

Par contre dans l'optique d'une étude génétique, la détermination du phénotype sera prioritaire. C'est pourquoi dans le cadre de notre travail la mesure de la concentration sérique en α_1 anti-trypsine et la mesure de son activité inhibitrice n'ont été réalisées qu'en complément des électrofocalisations.

4) GENETIQUE DE L' α_1 ANTI TRYPSINE : LE SYSTEME "Pi"

4.1 Caractère Mendélien: de la transmission de l' α_1 anti-trypsine

La première étude génétique de l' α_1 anti-trypsine date de 1963. A cette époque LAURELL et ERIKSSON (86) établirent une corrélation entre les déficiences en α_1 anti-trypsine et l'emphysème pulmonaire. Leurs observations ont concerné cinq sujets ayant une concentration sérique très basse en inhibiteur. Cette concentration atteignait seulement 10 pour cent de la valeur normale.

De 1964 à 1966, ces mêmes auteurs, puis KUEPPERS (76) ont étudié la descendance d'un sujet à faible taux d'inhibiteur. Ils ont noté que les descendants pouvaient présenter un taux intermédiaire si l'autre parent a possédé un taux normal.

Par ailleurs si les deux parents possèdent une concentration de type intermédiaire en inhibiteur la descendance présentera :

- pour un quart une concentration basse en inhibiteur
- un quart une concentration normale en inhibiteur,
- une moitié une concentration en inhibiteur de type intermédiaire.

Ces proportions sont bien en faveur d'une transmission Mendélienne de l' α_1 anti-trypsine.

4.2 Les allèles responsables de la transmission :

Nous exposerons tout d'abord les conclusions formulées par ERIKSSON (86) . Selon cet auteur les faibles concentrations en inhibiteur (de l'ordre de 25 ± 6 mg/100 ml) peuvent être considérées comme l'expression phénotypique d'une déficience homozygote.

- les concentrations intermédiaires en inhibiteur (de l'ordre de 120 ± 46 mg/100 ml) manifestent l'état hétérozygote.
- Les concentrations normales en inhibiteur (de l'ordre de 212 ± 32 mg/100 ml) correspondent à l'état "sain" homozygote.

A cette époque, ERIKSSON a envisagé l'existence d'un gène autosomique récessif. L'échantillonnage des cas était encore restreint et il se basait uniquement sur l'observation clinique. En effet les symptômes d'obstruction pulmonaire chronique apparaissent surtout chez les homozygotes et assez rarement chez les hétérozygotes. FAGHEROL en 1967 (45) a procédé à l'étude d'un vaste échantillonnage de la population norvégienne. Il en a conclu que les gènes contrôlant l'activité de l'inhibiteur appartiennent à des allèles ~~codominants~~ ^{codominants}.

Cette hypothèse n'a pas cessé d'être confirmée par les recherches ultérieures : nous citerons celles de FALLAT (50) , KUEPPERS (77) (76) , LIEBERMANN (89, 90) , TALAMO (127) et WELCH (138)

4.3 Le système Pi ("Protéase inhibitor")

Le système Pi, mis au point par LAURELL et FAGHEROL est une classi-

fication des bandes protéiques de l' α_1 anti-trypsine séparées par électrophorèse.

C'est ainsi qu'en 1972, FAGHEROL a recensé 17 phénotypes; depuis leur nombre ne fait qu'augmenter. (46)

4.3.1 Les bases du système Pi (figure 45)

Nous pouvons constater les faits suivants :

L'inhibiteur peut présenter jusqu'à 8 bandes quand nous procédons à une électrophorèse sur gel d'amidon à pH acide puis à une immuno-électrophorèse croisée.

L'électrofocalisation révèle essentiellement six bandes.

Les homozygotes normaux ("sauvages") et les homozygotes déficients peuvent présenter le même nombre de bandes. Toutefois ces bandes diffèrent : par leur mobilité électrophorétique et par leur concentration.

Les hétérozygotes possèdent des bandes appartenant aux deux types d'homozygotes. En effet le mélange de sérums provenant de chaque type d'homozygotes donne un profil protéique identique à celui d'un sérum d'hétérozygote.

Le gène sauvage est défini par l'expression PiM. Le phénotype normal est défini par MM, il sera reconnu par au moins 5 bandes, de situation anodique; deux d'entre elles sont très importantes, elles sont numérotées 4 et 6 dans la nomenclature de FAGHEROL; trois autres bandes sont plus minces elles sont numérotées 2, 7 et 8.

4.3.2 Les variants principaux dans le système Pi ("Protéase inhibitor")

Nous envisagerons successivement les variants PiZ, PiS, PiP, PiF.

Le Gène PiZ
=====

En double dose, le gène PiZ détermine le phénotype déficient ZZ.

Figure 45



Présentation schématique de 17 phénotypes Pi.

Pour des raisons de simplification, seules les bandes 4 et 6 de la classification de FAGHEROL ont été représentées pour chaque produit allélique.

(d'après FAGHEROL, modifié)

Ce phénotype possède seulement 15 pour cent de l'activité anti-trypsique du phénotype sauvage.

Ce variant est lent. Il se reconnaît d'une part à ses bandes plus catodiques que le phénotype MM, d'autre part à ses bandes 4 et 6 très minces.

Le Gène PiS

=====

En double dose, le gène PiS détermine le phénotype SS. Ce phénotype présente encore 60 pour cent de l'activité antitrypsique.

Ce variant est lent. Les bandes 4 et 6 sont importantes; leur situation est plus catodique que celles du phénotype MM, mais moins que celles du phénotype ZZ.

Le Gène PiP

=====

En double dose, le gène PiP détermine le phénotype PP qui possède 25 pour cent de l'activité antitrypsique du phénotype sauvage.

C'est un variant de rapidité moyenne. Les bandes sont minces.

Le Gène PiF

=====

En double dose le gène PiF détermine le phénotype FF. L'activité antitrypsique de ce phénotype est mal connue.

Il s'agit d'un variant rapide. Les bandes ont une localisation très anodique.

Le Gène PiI

=====

Le gène PiI est un variant anodique moins rapide que le phénotype précédent FF.

En fait, ce sont surtout les formes hétérozygotes que nous rencontrons. Nous pensons à MS, MZ, MF, FS, SZ, IM, IS, MP, PZ. Si l'on exclut le phénotype MF ces formes possèdent des activités anti-trypsiques généralement abaissées.

4.3.3. Les variants rares dans le système Pi

Quatre variants s'avèrent rares dans le système Pi. Nous pensons aux gènes PiX, PiV, PiW, PiN.

Le Gène PiX : il correspond à un variant lent.

Le Gène PiV

Le Gène PiW (GEDDE-DAHL) (55)

Le Gène PiW détermine le phénotype WW. Ce phénotype possède 70 pour cent de l'activité antitrypsique du phénotype sauvage.

Le Gène PiN (COX) (71)

Il s'agit d'un variant dont les bandes de migration sont intermédiaires entre celle de M et celle de P.

4.3.4. Les variants exceptionnels dans le système Pi

Parmi les variants tout à fait exceptionnels dans le système Pi nous citerons les gènes PiM^{Baldwin}, PiM^{Lamb}, PiE, PiG, PiY, PiB, PiL, PiC, PiD, (127).

4.3.5. Le variant Pi⁻ dans le système Pi

La première observation du variant Pi⁻ est due à TALAMO en 1973 (127) . Cet auteur a décelé un sérum dépourvu d' α_1 anti-trypsine chez

un homme de 24 ans, atteint d'emphysème sévère. L'hypothèse d'un gène d'expression nulle : Pi^0 ou Pi^- fut alors émise. Une observation de BLUNDELL (13) nous montrera les difficultés d'appréciation dans ce type de problème génétique. Cet auteur a pu observer une famille Irlandaise dans laquelle le gène Pi^0 est vraisemblablement associé aux gènes PiM , PiS et PiZ . Mais cette conclusion ne fut pas immédiate. En effet, l'observation a d'abord porté sur un homme de 41 ans, en bonne santé apparente. Son phénotype d'inhibiteur a été initialement estimé ZZ, d'après son protéinogramme.

Le typage familial fut alors réalisé. Il a donné les résultats suivants :

- la mère du propositus a un phénotype $Pi MM$
- la femme du propositus a un phénotype $Pi MS$
- le fils du propositus a un phénotype $Pi SS$
- la fille du propositus a un phénotype $Pi SZ$.

Mais la comparaison des résultats électrophorétiques de l'activité anti-trypsique a révélé certaines contradictions. En effet :

le propositus possède une activité anti-trypsique réduite à 5% de la valeur normale,

sa mère possède une activité anti-trypsique réduite à 54 % de la valeur normale,
son fils possède une activité anti-trypsique réduite à 32 % de la valeur normale.

Or nous savons que le phénotype ZZ présente encore au moins 15 % de l'activité anti-trypsique normale. Les 5 % d'activité de notre sujet ne conviennent donc pas à ce phénotype. Par ailleurs les activités anti-trypsiques de la mère (54 %) et du fils (32 %) sont beaucoup trop faibles pour convenir respectivement aux phénotypes $Pi MM$ et $Pi SS$.

Les résultats de l'électrophorèse ont alors été interprétés en faisant intervenir un gène nul : Pi^- .

- Le propositus possède un phénotype Z^- et non ZZ,
- sa mère le phénotype M^- et non ZZ
- son fils le phénotype S^- et non SS.

En France MARTIN et coll. (98) ont réalisé d'autres observations et ont confirmé l'existence de ce gène rare Pi^- . La fréquence de ce gène est encore difficile à déterminer.

4.4 La répartition des variants du système Pi

Pour les phénotypes les plus courants la variabilité est assez importante selon les populations envisagées. Elle est encore plus grande pour les phénotypes rares, dont la liste rappelons-le, ne cesse de s'allonger depuis les 17 cas recensés par FAGHEROL.

Envisageons quelques cas :

4.4.1 Cas du Gène sauvage PiM

Les chiffres vont de 85 à 95 % des populations, ils sont particulièrement bas en Espagne et au Portugal.

4.4.2 Cas du Gène PiS

Très rare chez les Coréens, les Lapons, les Finnois; par contre il est fréquent en Espagne et au Portugal.

4.4.3 Cas du Gène PiP

Le gène PiP est plus rare que les gènes PiZ ou PiS et nous ne le connaissons que sous sa forme hétérozygote MP ou PZ. Ces deux formes s'accompagnent souvent, mais pas toujours, d'un déficit de l'activité anti-trypsique. C'est pourquoi la mesure de l'activité anti-trypsique ne permet pas la distinction des hétérozygotes et des homozygotes normaux.

4.4.4 Cas du Gène PIF

Sa fréquence est particulièrement élevée en Islande.

4.4.5 Cas du Gène PiL

Actuellement le gène PiL n'a été identifié que chez un groupe ethnique restreint : il s'agit des populations Bantu

Pour conclure nous avons regroupé dans le tableau n° 13 les fréquences géniques, les fréquences dans la population, les concentrations et les activités d'un certain nombre de phénotypes du système Pi.

Tableau n° 13

Phénotypes	Concentration : sérique (en mg/100ml)	Activité en : % de l'acti- vité anti- trypsique normale	Activité anti : trypsique (en mg/ml)	Fréquence : génique	Fréquence : dans la population
MM	210-300	100	1,3	0,936	88 %
SS	80-112	63	0,53-0,6	0,038 0,05	-
ZZ	20-25	12-15	0,27	0,014 0,026	0,10 %
MS	167-195	80-88	0,87	-	7,3 %
MZ	120-145	60	0,76	-	3,5 %

4.5 Les problèmes posés par la génétique du système Pi

4.5.1 Cas des hautes fréquences de gènes déficitaires

Deux points ont retenu notre attention : il s'agit d'une part, dans toutes les populations, du taux élevé en hétérozygotes,

d'autre part, dans quelques groupes ethniques du taux relativement important en certains homozygotes.

Ces faits peuvent s'expliquer par un avantage sélectif et ce malgré l'aspect déficitaire de tout autre gène que le gène PiM.

Nous pouvons en effet supposer que l' α_1 anti-trypsine inhibe les protéases localisées dans la tête du spermatozoïde. Ces protéases sont indispensables à l'attaque de la membrane pellucide de l'ovocyte. Par conséquent un taux moindre en α_1 anti-trypsine diminue l'effet inhibiteur des protéases et doit faciliter les fécondations.

4.5.2 Relation entre les phénotypes électrophorétiques et le mécanisme mutationnel

La relation entre les profils électrophorétiques et le mécanisme mutationnel est encore obscure. Vraisemblablement une mutation ponctuelle est responsable de la position des bandes, mais ceci n'explique pas la multiplicité des bandes observées. Peut être pouvons nous attribuer cette multiplication à une polymérisation de l'inhibiteur ou à une interaction de ce dernier avec un constituant du tampon. Cependant les précautions que nous avons prises et les excellentes conditions d'électrophorèse que permet la focalisation réduisent les risques cités précédemment. Une réponse définitive pourra être donnée lorsque l'analyse séquentielle de l' α_1 anti-trypsine aura été réalisée.

Si nous acceptons l'hypothèse de la mutation ponctuelle, nous pouvons envisager soit une diminution de la biosynthèse de la protéine inhibitrice soit une accélération de l'élimination de cette protéine inhibitrice plus ou moins altérée dans sa structure.

Certaines expériences sont en faveur d'une modification de la biosynthèse de cette protéine. En effet les réponses des individus à une injection de vaccin anti-typhoïdique dépendent de leur phénotype d'inhibiteur. Ainsi chez les homozygotes MM, l'injection augmente de près de 100 % le taux d' α_1 anti-trypsine sérique.

Chez les hétérozygotes, il en va de même, ce qui les amène à un niveau normal. Par contre, les phénotypes ZZ présentent peu ou pas de variation.

Une constatation de LIBERMANN (91) va d'ailleurs dans le même sens. Il administre au sujet du diéthyl-stilboestrol par voie orale pendant

une quinzaine de jours. Il évalue alors le pouvoir anti-trypsique du sérum. Les augmentations obtenues sont comparables à ce que nous venons de voir après une injection de vaccin anti-typhoïdique.

Certains auteurs envisagent une modification de la copule glucidique de l' α_1 anti-trypsine :

En 1973, BELL et CARRELL ont comparé les mobilités électrophorétiques d'une α_1 anti-trypsine normale, purifiée à partir d'un sérum de phénotype sauvage MM, et celles de la même protéine après action plus ou moins complète de la sialidase. Ils ont constaté, après traitement par la sialidase une baisse de la mobilité électrophorétique. Par ailleurs la répartition des bandes après électrophorèse sur gel d'amidon acide évoquait les caractéristiques de l' α_1 anti-trypsine des homozygotes déficients. (9)

SHARP et FREIER (115) ont observé une rétention de l'inhibiteur modifié. En effet chez des sujets déficients en inhibiteur ils ont mis en évidence des inclusions cytoplasmiques de cette protéine dans leurs hépatocytes.

Nous ne pouvons à priori exclure aucune des interprétations précédentes. Quelque soient les expériences et les hypothèses nous retrouvons bien, avec l' α_1 anti-trypsine les problèmes théoriques de la génétique moléculaire.

- Si cette molécule a une structure normale, elle est immunochimiquement reconnue comme telle. Elle a une activité normale. Il lui correspond le phénotype sauvage.

- Si cette molécule a une structure modifiée, elle ne sera pas reconnue immunochimiquement. Elle a une activité diminuée. Il lui correspond les variants déficitaires.

- Si cette protéine a une structure modifiée, mais pas assez, elle pourra être reconnue normale immunochimiquement; cependant elle aura une activité diminuée. Ce sera alors un cas de "cross reacting material". Ce cas ne semble pas défini actuellement, mais une fois encore, c'est la convergence des méthodes qui s'impose.

4.6. Les phénotypes du système Pi et la pathologie

Dès corrélations entre des variants du système Pi et la pathologie ont été mises en évidence. Nous pensons notamment à des maladies hépatiques et respiratoires.

4.6.1 Les phénotypes du système Pi et les maladies hépatiques

La plupart des observations portent sur des phénotypes ZZ.

4.6.1.1. Phénotype ZZ et cirrhose

Les premières observations ont été faites sur des enfants atteints de cirrhose hépatique.

Ces enfants présentent une importante diminution des α_1 globulines et un taux d'inhibition sérique de la trypsine inférieur à 0,4 mg/ml. Pour tous ces cas, des biopsies hépatiques ont révélé un matériel acidophile important au niveau des dilatations du reticulum des hépatocytes. Par immunofluorescence on a identifié ce matériel acidophile à l'inhibiteur. Nous pouvons supposer que ces inclusions synthétisées sous le contrôle du gène PiZ ne peuvent sortir du reticulum des hépatocytes soit parce que la protéine a une structure primaire anormale, soit parce qu'elle est déficitaire en acide sialique (111)

Certains auteurs se demandent si les phénotypes déficients en α_1 antitrypsine ne sont pas plus exposés aux accidents hépatiques d'origine éthylique que les homozygotes de phénotype MM.

4.6.1.2 Phénotype ZZ et cholestérase

AAGNES (1) a trouvé chez cinq enfants de phénotype ZZ atteints de cholestase les mêmes inclusions acidophiles que chez les enfants atteints de cirrhose hépatique.

4.6.1.3 Phénotype ZZ et hépatite

PORTER en 1972 (111) a étudié des enfants de phénotype ZZ atteints d'hépatite et porteurs de l'antigène Australia.

Les corrélations entre le phénotype ZZ et l'hépatocarcinome ont été discutées.

4.6.2 Les Phénotypes du système Pi et les maladies respiratoires

4.6.2.1. La détresse respiratoire du nouveau né

Ce syndrome a été signalé chez des enfants de phénotype MM. Malgré ce phénotype ils présentent un très faible taux d' α_1 anti-trypsine. Chez ces enfants aucune inclusion hépatique n'a été observée. Par contre leur membrane hyaline pulmonaire devient fortement fluorescente en immuno-fluorescence anti α_1 anti-trypsine. Dans ces cas nous concluons que le bas niveau sérique de l'inhibiteur est en relation avec sa forte adsorption au niveau pulmonaire.

4.6.2.2. L'obstruction pulmonaire chronique (C.O.P.D.)

Le syndrome de C.O.P.D. se caractérise par une apparition relativement précoce des symptômes, vers 35 ans. Il se manifeste par une détérioration des fonctions pulmonaires beaucoup plus rapide que dans l'emphysème classique. Nous observons corrélativement une diminution de la ventilation et une opacité radiologique de la base pulmonaire.

Nous envisagerons successivement les phénotypes ZZ et les hétérozygotes MZ et MP.

Cas des Phénotypes ZZ

Le syndrome de C.O.P.D. a été retrouvé chez 60 % des sujets de phénotype ZZ. Réciproquement, un pour cent des cas d'emphysème se rattache à ce même phénotype. Une légère prédominance statistique des sujets masculins a été signalée mais les effets de l'environnement et du tabagisme suffisent à expliquer ce fait.

Il est admis que la protection du tissu pulmonaire implique une concentration en inhibiteur à un taux supérieur à une valeur seuil. En effet la maladie n'apparaît que pour une synthèse en inhibiteur réduite au tiers de sa valeur normale. C'est pourquoi FAGERHOL (46) considère que la probabilité d'atteindre les hétérozygotes est faible.

Le défaut d'inhibition des enzymes protéolytiques chez les phénotypes ZZ est supposé provoquer une dégradation des fibres conjonctives pulmonaires. Il en résulte un élargissement alvéolaire.

L'emphysème est une lésion pulmonaire dont l'apparition est sensiblement proportionnelle à l'âge des malades et tout se passe comme si les individus de phénotype ZZ possédaient une histologie pulmonaire précocement vieillie. L'élastase est sans doute la protéase principale. Son inhibition est indispensable. Nous constatons en effet que les sujets déficitaires en α_1 anti-trypsine, mais à faible activité de l'élastase leucocytaire se prêtent à un meilleur pronostic que les sujets déficients en α_1 anti-trypsine mais d'activité élastique normale.

Cas des hétérozygotes MZ et MP

Le dépistage des hétérozygotes MZ et MP est difficile. Des cas de phénotype MZ ont été signalés. Le seul signe clinique est une diminution de l'élasticité pulmonaire. Un dépistage préventif des hétérozygotes a été proposé. Ils sont en effet plus sensibles que les phénotypes MM à la pollution industrielle ou tabagique.

Le dépistage anténatal des déficits en inhibiteur, proposé par COOK (25), semble impossible par amniocentèse entre la 13e et la 16e semaine. En effet l' α_1 anti-trypsine du liquide amniotique est d'origine maternelle et il faudrait envisager un prélèvement du sang foetal.

5) RECHERCHES PERSONNELLES

5.1. Techniques employées

5.1.1 Détermination de la concentration sérique en α_1 anti-trypsin

Pour déterminer la concentration en α_1 anti-trypsin sérique, nous avons employé la méthode de MANCINI avec des plaques Behringwerke.

5.1.2 Détermination des phénotypes

La détermination des phénotypes a été réalisée par électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide, dans la gamme de pH comprise entre 4 et 6. Nous avons préparé les plaques conformément à la technique exposée antérieurement, sans employer de riboflavine. Il s'agit de la technique simplifiée d'ARNAUD (7).

Les dépôts de sérum ont été effectués du côté catodique, à raison de 5 microlitres par carré de papier filtre.

L'électrophorèse puis la coloration du gel ont été réalisées selon la technique classique.

5.2. Matériel employé

Nous avons travaillé sur des sérums de malades hospitalisés au C.H.R. de SAINT ETIENNE. Ils nous ont été fournis par le Service de Chimie Biologique du Docteur GIBAUD. Ils ont été choisis essentiellement dans les services de pneumologie et de gastro-entérologie.

5.3. Résultats globaux

Nous avons déterminé les phénotypes d' α_1 anti-trypsine pour 252 sérums. Nous donnons dans le tableau n°14 d'une part la répartition de ces phénotypes, d'autre part la concentration sérique en α_1 anti-trypsine exprimée en mg/100 ml.

Tableau n° 14

Phénotype	Répartition	Concentration moyenne en α_1 anti-trypsine (en mg/100ml)
M M	240	250
M Z	1	128
M S	7	180
S S	3	90
?	1	20

Les photographies suivantes représentent les protéinogrammes obtenus pour les divers phénotypes que nous avons eus l'occasion de déterminer.

Photo n° 4

Phénotype M M

Le phénotype M M est caractérisé par six bandes protéiques de situation moyenne. Trois d'entre elles sont particulièrement importantes.

Photo n° 5

Phénotype M Z

Le phénotype M Z est caractérisé par la présence de bandes de faible intensité, les deux bandes les plus nettes se trouvant du côté de la cathode.

Phénotype M S

Le phénotype M S se caractérise par la présence de deux bandes de type M et par deux bandes lentes importantes (du côté catodique).

Photo n° 6

Phénotype S S

Le phénotype S S se caractérise par l'absence de bandes de situation anodique et par la présence d'une bande lente de situation catodique.

Phénotype ?

Ce phénotype se caractérise par des bandes extrêmement faibles, comme cela se produit dans le cas des phénotypes Z. De plus, elles paraissent souvent dédoublées sur les protéinogrammes, mais la présence d'une bande lente catodique évoque un phénotype S. L'observation de ce protéinogramme amène l'hypothèse d'un phénotype S Z.

Photo n° 7

5.4. Cas intéressant la pathologie

Parmi les phénotypes que nous avons déterminés, nous avons remarqué la présence de deux phénotypes MZ et d'un phénotype peu connu ?

5.4.1 Le Phénotype MZ

Le sujet correspondant à ce phénotype MZ ne présente aucun signe clinique. Sa concentration sérique en α_1 anti-trypsine est de 150 mg/100 ml (alors que la valeur moyenne pour ce phénotype est de l'ordre de 128 mg/100 ml). Son fils, de phénotype ZZ, a été reconnu antérieurement déficient en

α_1 anti-trypsine, avec une concentration sérique de 80 mg/100 ml; de plus, il a présenté un ictère néo natal modéré. Une ponction biopsie du foie avait été effectuée : elle montrait des granulations intra-hépatocytaires d' α_1 anti-trypsine. Au moment où nous avons effectué ces recherches, l'enfant se portait bien, malgré son phénotype ZZ et malgré les signes histologiques.

Nous avons également vérifié les phénotypes de la mère, des deux tantes et du grand-père maternel de cet enfant. Tous ces phénotypes sont MZ. Ils ne s'accompagnent d'aucun signe clinique particulier.

5.4.2 Le Phénotype peu connu ?

Nous avons observé ce phénotype peu connu sur un sujet de 62 ans, atteint d'insuffisance respiratoire sévère. Le malade a été hospitalisé en avril 1975. Il était cachectique, dyspnéique même au repos, avec une hépatomégalie. Il présentait des signes d'insuffisance cardiaque. La radiographie pulmonaire avait décelé une fibrose importante. Nous avons réalisé l'étude du sérum de ce malade par électro-focalisation et nous l'avons complétée par d'autres examens biologiques. Les paramètres obtenus sont regroupés dans le tableau n°

Tableau n° 15

α_1 anti-trypsine	20 mg/100 ml
Transferrine	70 mg/100 ml
α_1 globulines	1 %
Immunoglobulines	très augmentées
dont :	
IgA	646 mg/100 ml
IgG	1875 mg/100 ml
IgM	186 mg/100 ml

Nous remarquerons la faible activité anti-trypsique de ce sérum : 20 mg/100 ml. L'ensemble de ces résultats évoque le profil d'une cirrhose. Nous pouvons supposer que le déficit en α_1 anti-trypsine devait avoir un retentissement sur le foie du sujet qui, par ailleurs, n'était pas alcoolique. Aucun prélèvement n'a pu être fait, le malade étant décédé brusquement au cours d'une hémoptysie.

Le protéinogramme de ce malade s'est avéré intermédiaire entre celui d'un phénotype SS et celui d'un phénotype ZZ. Ce phénotype ne pouvait être confirmé que par cross immuno électrophorèse.

6) CONCLUSION

L'électro-focalisation sur gel de polyacrylamide en gradient d'amphoclines, présente plusieurs avantages évidents pour ce type de recherche en génétique humaine. En effet, cette technique relativement rapide permet des dépistages en série puisqu'en moyenne nous pouvons effectuer quatorze dépôts sur la même plaque. Les résultats obtenus sont facilement reproductibles.

Les méthodes d'analyse étant devenues de plus en plus fines, la multiplicité allélique se manifestera d'autant plus aisément. La revue

des travaux effectués sur le système "Protease inhibitor" nous montre combien sa complexité s'est accrue depuis les recherches d'ERIKSON et de FAGHEROL.

Nous avons testé 252 sérums par électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide, nous ne pouvons, vu le nombre de résultats, nous permettre une interprétation statistique. Par contre nous avons mis en évidence un phénotype rare. Ce phénotype semble intermédiaire entre les phénotypes SS et ZZ. Il est en corrélation avec un tableau clinique où se rencontrent à la fois des troubles pulmonaires et des troubles hépatiques. Ces faits sont en bon accord avec les connaissances actuelles sur la pathologie de l' α_1 anti-trypsine.

Pour les phénotypes rares, la simplicité d'emploi de la technique d'électro-focalisation ne doit pas nous cacher les difficultés survenant dans l'interprétation des protéinogrammes. C'est ainsi que l'examen des protéinogrammes nous a permis d'envisager l'existence du phénotype SZ qui est un phénotype relativement rare. Mais il conviendrait de confirmer cette hypothèse en utilisant une méthode complémentaire : la cross-immuno-électrophorèse.

Sur le plan clinique, le typage par électro-focalisation paraît souhaitable dès qu'une déficience en α_1 anti-trypsine sera observée. En effet dans les cas d'emphysème précoce, d'obstruction pulmonaire chronique ou de cirrhose néonatale, la mise en évidence sur le protéinogramme des allèles Z,S,P ou O doit permettre l'estimation des risques.

Nous pouvons aller plus loin et envisager également le typage en vue d'une prévention éventuelle.

Nous pensons que dans un proche avenir l'analyse des séquences de l' α_1 anti-trypsine apportera les précisions nécessaires à la compréhension des variants phénotypiques de cette anti-protéase sérique.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans la première partie de notre travail nous avons envisagé les diverses techniques d'électrophorèse utilisables à des fins chimio-taxonomiques : électrophorèse sur gel de polyacrylamide, électrofocalisation sur colonne, électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide. La préparation des extraits protéiques végétaux a particulièrement retenu notre attention. Nous avons confirmé la nécessité de réaliser les extractions en milieu réducteur. A cet effet, nous avons utilisé le 2 mercaptoéthanol ou le dithiothréitol. Nous avons également précisé les conditions de purification et de concentration des extraits protéiques. Pour opérer les électrophorèses dans des conditions optimales, nous avons dû évaluer la teneur en protéines solubles de nos extraits. La méthode de Lowry s'est avérée inapplicable. La méthode de Bramhall et Loewenberg a donné des résultats décevants. Ces faits nous ont conduit à modifier la technique de Bramhall et Loewenberg, et à préciser les conditions d'élution des complexes.

Les recherches effectuées sur des Pézizales et sur des Solanacées à l'aide de ces diverses techniques d'électrophorèse nous ont montré la plus grande précision et la plus grande rapidité des

méthodes d'électrofocalisation. Ces qualités sont encore beaucoup plus manifestes si nous utilisons l'électro-focalisation sur couche mince de polyacrylamide. Aussi avons-nous retenu cette dernière technique pour les recherches ultérieures.

La deuxième partie de notre travail est une illustration de ces méthodes en chimiotaxonomie. A cet effet, nous avons utilisé un matériel végétal très divers. Un chapitre a été consacré à l'étude des protéinogrammes et des acides aminés libres de six Pézizales. Nous avons noté une convergence certaine entre les résultats obtenus par électrofocalisation et la composition en acides aminés libres. Par ailleurs nos six Pézizales possèdent sur leur protéinogramme une bande importante vers pH 4 et sont dépourvues de certains acides aminés libres comme la cystéine, la tyrosine et les acides aminés hétérocycliques. Ces résultats nous conduiraient comme l'avait fait BOUDIER à regrouper ces six espèces dans la famille des Morchellacées.

L'examen du protéinogramme d'une souche douteuse de *Morchella* nous a permis de l'identifier à *Morchella hortensis*. Enfin les protéinogrammes de *Disciotis venosa* et de *Verpa digitaliformis* se différencient nettement de ceux des *Morchella*.

Dans le chapitre suivant, seule la méthode d'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide a été retenue pour étudier les protéines solubles contenues dans les graines de neuf Abiétacées appartenant au genre *Pinus*, *Abies* et *Cedrus*. Les graines représentent un matériel de choix pour l'établissement des protéinogrammes. Nous avons remarqué sur ces protéinogrammes la présence de deux bandes protéiques communes aux neuf Abiétacées, situées entre pH 6,6 et pH 6,8. *Pinus pinea* et *Pinus nigra*

possèdent des bandes catodiques et anodiques caractéristiques par rapport aux autres espèces du genre *Pinus*. Il est possible que ces différences dans les protéinogrammes soient parallèles à la subdivision du genre *Pinus* en section Pinaster (*Pinus pinea* et *Pinus nigra*) section Strobilus (*Pinus strobus*) et section Toeda (*Pinus coulteri*). Nous nous proposons de vérifier ultérieurement cette hypothèse en nous procurant plusieurs *Pinus* appartenant à ces différentes sections.

L'étude des protéinogrammes permet aussi de distinguer nettement les genres *Cedrus* et *Abies*.

Chez les Angiospermes, la famille des Solanacées a retenu notre attention. Une étude des protéinogrammes et des acides aminés libres a été réalisée chez six *Datura*. La convergence des résultats a été excellente. Les six *Datura* étudiés possèdent quatre bandes comprises entre pH 6 et pH 7. L'identité de *Datura stramonium* et de *Datura tatula* apparaît complète si nous nous reportons à leur protéinogramme et à leur composition en acides aminés libres. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Madame DEBELMAS (32). Cet auteur avait fait une étude des polyphénols et des alcaloïdes de ces deux *Datura*. Nous apportons donc des arguments supplémentaires aux Systématiciens qui, contrairement à LINNE considèrent *Datura tatula* comme une variété de *Datura stramonium*.

Datura inoxia a été longtemps confondu avec *Datura metel*. Nous remarquerons que son protéinogramme s'en différencie nettement par ses bandes de situation très anodique. Le protéinogramme de *Datura inermis* serait plus proche de celui de *Datura metel* par ses bandes de situation catodique.

Les caractéristiques des protéinogrammes d'*Atropa belladonna*; de *Scopolia stramonifolia*, de *Hyoscyamus niger*, de *Hyoscyamus albus* et de l'hybride *Hyoscyamus albus* x *Hyoscyamus niger* ont également été précisées. Chez ces trois *Hyoscyamus*, nous remarquons une large bande protéique à pH 9,8, absente dans les autres genres. Si l'hybride possède des bandes communes à *Hyoscyamus albus* et à *Hyoscyamus niger*, l'allure générale de son protéinogramme est plus proche que celui de *Hyoscyamus niger*. Ce fait est confirmé par l'examen morphologique.

Lors de cette étude sur les protéinogrammes des graines, nous avons parfois constaté une grande complexité qui rend l'interprétation délicate. Il nous paraîtrait, dans certains cas, souhaitable de procéder à un fractionnement préalable des protéines sur colonne de Sephadex, et de réaliser les protéinogrammes de ces fractions.

La dernière partie de ce travail concerne un problème de biologie : l'étude de quelques variants de l' α_1 anti-trypsine sérique. L'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide est une technique de choix pour ce genre de recherche. Elle nous a permis de tester deux cent cinquante deux sérums et de mettre en évidence un phénotype relativement rare de l' α_1 anti-trypsine : le phénotype SZ. Sur le plan clinique ce phénotype était en corrélation avec des troubles pulmonaires et hépatiques, ce qui est en bon accord avec la pathologie de l' α_1 anti-trypsine. Il conviendrait de confirmer ce phénotype par cross-immuno-électrophorèse.

Il est permis de penser qu'un jour l'analyse des séquences de l' α_1 anti-trypsine sera réalisée et apportera les précisions nécessaires à la compréhension de ses variants phénotypiques.

De même, dans une perspective d'avenir, nous pouvons avec M. BIDAULT (12) imaginer une taxonomie protéique dans laquelle les structures primaires des protéines seraient connues pour chaque espèce, ce qui conduirait à leur description génétique complète.

CONCLUSIONS

Nous avons envisagé dans ce travail l'application des méthodes d'électrophorèse et d'électrofocalisation à divers problèmes de systématique et de biologie

Le dosage des protéines végétales s'est avéré particulièrement délicat en raison de la présence de polyphénols. Pour éliminer le plus possible ces composés, les extractions protéiques ont été réalisées en présence d'un réducteur : mercapto-éthanol ou dithiothréitol, et d'un agent de précipitation : la polyvinylpyrrolidone. Comme les polyphénols oxydables perturbent la réaction de Lowry, nous avons dû mettre au point une méthode de dosage colorimétrique basée sur la réaction de Bramhall.

La comparaison des techniques d'électrophorèse traditionnelle en tubes de gel de polyacrylamide et de l'électrofocalisation sur colonne ou sur couche mince de polyacrylamide, effectuée sur six espèces de Pezizales nous a conduit à abandonner l'électrophorèse traditionnelle. L'examen des protéinogrammes nous a permis d'identifier une espèce incertaine à *Morchella hortensis*, de préciser les affinités entre *Morchella hortensis*, *Morchella intermedia* et *Morchella esculenta* et de noter les différences entre les genres *Disciotis* et *Verpa*. Nous avons complété notre travail par l'étude des acides aminés libres de ces six Pezizales. Les résultats obtenus manifestent une réelle convergence avec les précédents.

La deuxième partie de nos recherches concerne les Gymnospermes. Les protéinogrammes obtenus par électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide nous ont permis de préciser les affinités de cinq espèces du genre *Pinus* et de noter certaines différences avec les genres *Cedrus* et *Abies*.

Un autre chapitre de notre travail concerne la famille des Solanacées. Plusieurs espèces du genre *Datura* ont été étudiées. Les protéinogrammes confirment l'analogie entre *Datura stramonium* L. et *Datura tatula* L. Ils précisent les affinités de *Datura stramonium* avec *Datura innoxia*, *Datura inermis* et *Datura Metel*. L'étude des acides aminés libres apporte des arguments convergents. Nous avons également fait une comparaison avec les protéinogrammes d'*Atropa belladonna*, de divers *Hyoscyamus* et de *Scopolia stramonifolia*.

Enfin nous avons retenu la méthode d'électrofocalisation sur couche mince de polyacrylamide pour aborder un problème de génétique moléculaire. Notre étude a porté sur une anti-protéase sérique dont l'intérêt clinique est grandissant : il s'agit de l' α_1 anti-trypsine. Parmi les 252 sérums examinés, nous avons identifié un variant rare : le variant SZ.

Vu, le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques,

Le Président de la Thèse :

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 26 octobre 1976

Le Président de l'Université Claude-Bernard,

D. GERMAIN

L. ODDOUX

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AAGENAES (O.), MATLARY (A.), ELCJOK (R.), MUNTHE (E.) et FAGERHOL (M.K.) Neonatal cholestasis in α_1 anti-trypsin deficient children. *Acta Paediat. Scand.* (1972), 61, 632-642.
- (2) ALLEN (R.C.) Separation and quantification of mouse plasma esterases by discontinuous electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gel. Contact report Pr. 485648-3. *Nat. Inst. Environmental health Sciences* (1973).
- (3) ANDREUX (J.P.), BREDON (M.), ROCHEMAURE (J.) et MEYER (A.) Identification des types héréditaires de l' α_1 anti-trypsin par électrophorèse en gel d'acrylamide-agarose à pH = 4,8. *Path. Biol.* (1973), 22, n° 3, 277-283.
- (4) ALSTON (R.E.) et TURNER (B.L.) Biochemical Systematics. *Prentice Hall Inc.* Englewood Cliffs, New-Jersey (1963).
- (5) ALSTON (R.E.) et TURNER (B.L.) Biochemical methods in Systematics in Plant Biology to day, advances and challenges. *Mac Millan Londres* (1966) 92-113.
- (6) ALTSCHUL (A.), YATSU (L.Y.), ORY (R.L.) et ENGLEMAN (E.M.) Seed Proteins *Ann. Rev. Plant. Physiol.* (1966), 35, 113-136.
- (7) ARNAUD (Ph.), CHAPUIS-CELLIER (C.) et CREYSSEL (R.). The Pi-system : its study by means of thin layer-gel electrofocusing in polyacrylamide gel. 22° Coll. *Prot. Biol. Fluids* Ed. H. Peeters : Pergamon Press. (1974), 515-519.
- (8) AUTRAN (J.C.) et BOURDET (A.). Nouvelles données permettant l'exploitation de l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines du grain de blé en vue d'une identification variétale. *C.R. Acad. Sc.* (1973), 277, 2081-2084.
- (9) BELL (O.F.) et CARRELL (R.W.) Basis of the defect in α_1 anti-trypsin deficiency. *Nature* (1973), 243, 410-411.

- (10) BENT (K.J.) Electrophoresis of proteins of 3 *Penicillium* species on acrylamide gels. *J. Gen. Microb.* (1967), 49, 195-200.
- (11) BIANCO (H.L.). An electrophoretic survey of proteins in mycelial extracts of species of *Fusarium* . *Can. J. Bot.* (1970), 40, 533-541.
- (12) BIDAULT (M.) Variation et spéciation chez les végétaux supérieurs. (1971). Doin Ed.
- (13) BLUNDELL (G.), COLE (R.B.), NEVIN (N.C.) et BRADLEY (B.). α_1 anti-trypsin null gene (Pi^{-}). *The Lancet* (1974), n° 7877, vol. II, p. 404.
- (14) BONNIER (G.) Flore complète illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique. Ed. Orlhac, Paris.
- (15) BOUDIER (E.) Histoire et classification des Discomycètes d'Europe. (1907) Paris 220 p.
- (16) BOULTER (D.) The evolution of plant proteins with special reference to higher plant cytochromes C. *Curr. Advances Pl. Sci.* (1974), 4, p. 1-16.
- (17) BRAMHALL (J.) et LOWENBERG (D.). Colorimetric methods applied to determination of extracted proteins. *J. Biol. Chem.* (1969), 910, 120-125.
- (18) CAMUS (L.) et GLEY (E.). Action du sérum sanguin sur quelques ferments digestifs. *C.R. Soc. Biol.* (Paris) (1897), 49, 825.
- (19) CENTI-GROSSI (M.), TASSI-MICCO (C.) et SILANO (V.). Albumin fractionation of green coffee seed varieties by acrylamid gel electrophoresis. *Phytochem.* (1969), 8, 1749-1751.
- (20) CHANG (L.O.) et STEWARD (F.C.) Electrophoretic separation of the soluble proteins of *Neurospora* (1962), 193, 756-759.

- (21) CLARE (B.J.) Starch gel electrophoresis of proteins as an aid in identifying fungi. *Nature* (1963), 200, 803-805.
- (22) CLARE (B.J.), FLENTJE (N.T.) et ATKINSON (M.R.) Electrophoretic patterns of oxydoréductases and other proteins in fungal Taxonomy. *Austral J. Biol. Sci.* (1968), 21, 275-295.
- (23) CLARE (B.J.) et ZENTMYER (G.A.) Starch gel electrophoresis of proteins from species of *Phytophthora*. *Phytopath.* (1966), 56, 1334-1335.
- (24) CLARKSON (R.B.), HUANG (F.H.), CECI (F.C.) et GINGERICH (L.A.) Variability of soluble seed proteins, peroxidase and leucine-aminopeptidase in population of *Juglans nigra*. *Biochem. Syst. Ecol.* (1974), 2, 59-66.
- (25) COOK (P.J.L.) The genetics of α_1 anti-trypsin : a family study in England and Scotland. *Ann. Human Genet. Lond.* (1975), 38, 275.
- (26) COULSON (C.D.) Proteins of various species of wheat and closely related genera and their relationship characteristics. *Nature* (1964), 202, 1305-1308.
- (27) COS (D.W.) et CELHOFFER (L.) Inherited variants of α_1 anti-trypsin : a new allele Pi N. *Can. J. Genet. Cytol.* (1974), 16, 297-303.
- (28) CRAWFORD (I.), DAWN (A.) et STEVENSON (D.) α_1 anti-trypsin deficiency associated with PZ and MP phenotypes. Clinical and laboratory correlation. *Amer. J. of Medicine* (1974), 57, 2, p. 210.
- (29) CROWDEN (R.K.), HARBORNE (J.B.) et HEYWOOD (V.H.) Chemosystematics of the *Umbelliferae*. A general survey. *Phytochem.* (1969), 8, 1964-1984.
- (30) DAVIES (H.)
Protides Biol. fluids (1969), 19, 389-392.
- (31) DAVIS (B.J.) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* (1964), 121, 404-424.

- (32) DEBELMAS (A.M.) Etude comparative de *Datura stramonium* L. et de *Datura tatula* L. Rapport du contrat de recherche n° 34 bis (1970) 1 fascicule ronéo 44 pages.
- (33) DENNIS (R.W.G.) British Ascomycetes. *Cramer J. Lehne* (1968), 445 p.
- (34) DERBYSHIRE (E.) et WHITTON (B.A.) A disc electrophoretic study of proteins of blue-green algae. *Phytochem.* (1968), 7, 1355-1360.
- (35) DESBOROUGH (S.L.) et PELOQUIN (S.J.) Estérases isozymes from *Solanum* tubers. *Phytochem.* (1967), 6, 989-994.
- (36) DEYSSON (G.) et MASCRE (M.) (1971). Cours de Botanique Générale. Tome II.
- (37) DICKERSON (R.E.) The structure and history of an ancient protein. *Sci. Amer.* (1972, 226, 58-72.
- (38) DUMITRESCU (M.) et CARTIER (D.) Etude électrophorétique des isopéroxydases chez quelques espèces du genre *Plantago* L. *C.R. Hebd. Séances Acad.Sci.* (1971), 272, 1495-1498.
- (39) DUMITRESCU (M.) et GUERN (M.) Polyploïdie et qualité de quelques enzymes de *Hippocrepis comosa* L. *C.R. Acad. Sc. Paris* (1971), 273 (D), 59-62.
- (40) DURBIN (R.D.) Comparative gel electrophoretic investigations of the protein patterns of *Septoria* species. *Nature* (1966), 210, 1186-1187.
- (41) DURZAN (D.J.) et CHALUPA (V.) Free sugar amino-acids and soluble proteins in the embryo and female gametophyte of Jack pine as related to climate at the seed source. *Can. J. Bot.* (1968), 46, 417-428.
- (42) EDELMAN (G.M.), CONNINGHAM (G.N.) et WANG (J.L.) The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* (1972), 69, 2580-2584.

- (43) EMBERGER (L.) Les végétaux vasculaires. (1960) - Tome II
Fasc. I. 393-433.
- (44) EMBERGER (L.) Les végétaux vasculaires. (1960) - Tome II.
Fasc. II. 778-788.
MASSON et Cie
- (45) FAGERHOL (M.K.) Serum Pi types in Norwegians. *Acta Path. Microbiol. Scand.*
(1967), 70, 421-8.
- (46) FAGERHOL (M.K.) Le système Pi, sa génétique et ses rapports avec les mala-
dies. *Poumon Coeur* (1971), 27, 41-51.
- (47) FAGERHOL (M.K.) et BRAEND (M.) Serum prealbumins : polymorphism in man.
Science (1965), 149, 986-987.
- (48) FAGERHOL (M.K.) et HAUGE (H.E.) The Pi phenotype MP. *Vox Sang.* (1968),
15, 396-400.
- (49) FAGERHOL (M.K.) et LAURELL (C.B.) The Pi system inherited variants of
serum α_1 anti-trypsin III. *Progress in medical genetics* Londres
(1970), vol. III, 96.
- (50) FALLAT (R.), KUEPPERS (R.) et POWELL (M.) Chronic obstructive lung
disease with intermediate deficiency of α_1 anti-trypsin. *Clin. Resp.*
(1969), 17, 413.
- (51) FAWCETT (J.S.) Isoelectric focusing using polyacrylamid gels. *Sciences*
Tools (1968), 14, 24-26.
- (52) FOX (D.J.), THURMAN (D.A.) et BOULTER (L.D.). Studies on the proteins of
seeds of the *Leguminosae*. *Phytochem.* (1964), 3, 417-419.
- (53) FRATER (R.) Physical properties of ampholine carriers. *Analytical Biochem.*
(1970), 38, 536-538.

- (54) GANROT (P.O.) et BJERRE (B.) α_1 anti-trypsin and α_2 macroglobulin concentration in serum during pregnancy. Autosomal linkage between the Gm and Pi Loci in man. *Ann. Human Genet.* (1972), 35, 393-399.
- (55) GEDDE-DAHL (T.), FAGERHOL (M.K.), COOK (P.J.) et NOADES (J.) Autosomal linkage between the Gm and Pi Loci in man. *Ann. Human Genet.* (1972), 35, 393-399.
- (56) GIBBS (R.D.) History of Chemical Taxonomy. In *Taxonomy Chemical plant*. Ed. Swain London, New York (1943), 41-88.
- (57) GILL (H.S.) et POWELL (D.) Polyacrylamid gel electrophoresis of physiologic races A 1 to A 8 *Phytophthora fragariae*. *Phytopath.* (1968), 58, 722-723.
- (58) GOULLET (P.) Fractionnement des protéines bactériennes par électrophorèse en gel de polyacrylamide agarose. *Experientia* (1969), 25, 89-11.
- (59) GRELET (L.J.) Discomycètes de France, d'après la classification de BOUDIER *Bull. Soc. Bot. Centre Ouest* (1932), 129, 22-28.
- (60) GRELLET (F.), MILHOMME (H.) et GUITTON (Y.) Etude des protéines au cours de la germination du Radis. Séparation électrophorétique des protéines solubles de cotylédons étiolés. *Physiol. Vég.* (1971), 9, 119-127.
- (61) HAGLUND (H.) Isoelectric focusing in natural pH gradients. A techniques of growing importance for fractionation and characterization of proteins. *Sci. Tools* (1967), 14, 2-17.
- (62) HAGLUND (H.) Methods of Biochemical analysis. Ed. Glick D. New York (1971), 215 p.
- (63) HALL (R.) *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium Dahliae* distinguished by acrylamide gel electrophoresis of proteins. *Can. J. Bot.* (1969), 47 2110-2111.
- (64) HALL (R.), ZENTMYER (G.A.) et ERWIN (D.C.) Approach to taxonomy of *Phytophthora* through acrylamid gel electrophoresis of Proteins. *Phytopath.* (1968), 59, 776-774.

- (65) HARBORNE (J.B.), BOULTER (D.) et TURNER (B.L.) Chemotaxonomy of *Leguminosae*. Ed. Turner Londres New-York. (1971).
- (66) HART (G.E.) et BHATIA (C.R.) Acrylamid gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from *Nicotiana* species. *Canad. J. Gen. Cytol.* (1966), 9, 367-374.
- (67) HEGNAUER (R.) Chemotaxonomie der Pflanzen. Ed. Birkhauser Bâle et Stuttgart (1962).
- (68) HEIMBURGER (N.), HAUPT (H.) et SCHULTZE (H.E.) Bausteinanalysen von Human serumproteinen. *Clin. Chim. Acta* (1964), 10, 293-307.
- (69) HEYWOOD (V.H.) Phytochemistry and Taxonomy. In : Comparative Phytochemistry Ed. Swain London et New York (1966), 1-20.
- (70) JACOBSSON (K.) Studies on the trypsin and plasmin inhibitors in human blood serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1955), 7, Suppl. 14, 83-86.
- (71) JAMES (K.), COLLINS (M.L.) et FUDENBERG (H.H.) A semi-quantitative procedure for estimating serum antitrypsin levels. *J. Lab. Clin. Med.* (1966), 67, 528.
- (72) JOHNSON (A.M.) et ADPER (C.A.) Deficiency of α_1 anti-trypsine in children liver disease. *Pediatrics* (1975), 46, 921-5.
- (73) JOHNSON (L.B.), BARNHART (D.) et HALL (O.) Analysis of genome and species relationships in the polyploid wheats by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.* (1967), 54, (9), 1089-1098.
- (74) JOHNSON (L.B.) et HALL (O.) Analysis of phylogenetic affinities in the *triticeinae* by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.* (1965), 52, (5), 506-513.
- (75) KUEPPERS (F.) Genetically determined differences in the response of α_1 anti-trypsine levels in human serum to typhoid vaccine. *Humangenetik* (1968), 6, 207-214.

- (76) KUEPPERS (F.) α_1 anti-trypsin : physiology, genetics and pathology. *Humangenetik* (1971), 11, 177-189.
- (77) KUEPPERS (F.). Human α_1 anti-trypsin. *Environmental Res.* (1973), 6, 403-423.
- (78) KUEPPERS (F.) et BEARN (A.G.) A possible experimental approach to the association of hereditary α_1 anti-trypsin in deficiency and pulmonary emphysema. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1966), 121, 1207-1209.
- (79) KUEPPERS (F.W.) et BEARN (A.G.) An inherited α_1 anti-trypsin variant *Humangenetik* (1965). 4, 217-220
- (80) KUEPPERS (F.), BRACKERTZ (D.) et CZYGAN (P.J.) Serum α_1 anti-trypsin levels during the ovarian cycle. *Clin. Chim. Acta* (1972), 39, 131-134.
- (81) KUEPPERS (F.), BRISCOE (W.A.) et BEARN (A.G.) Hereditary deficiency of serum α_1 anti-trypsin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1966), 146, 1678-1679.
- (82) GYORFFY (B.), MELCHERS (G.) Die Herstellung eines fertilen, amphidiploiden Artbastards *Hyoscyamus niger* x *Hyoscyamus albus* durch Behandlung mit Kolchizininlösungen. (1938). *Sonderdruck aus Die Naturwissenschaften* 26. Jahrg., Heft 33, S 547.
- (83) KULIK (M.M.) et BROOKS (A.G.) Electrophoretic studies of soluble proteins from *Aspergillus* sp. *Mycologia* (1970), 62, 365-376.
- (84) LADIZINSKY (G.) et JOHNSON (B.L.) Seed protein homologies and the evolution of polyploidy in *Avena*. *Canad. J. Genet. Cytol.* (1972), 14, 875-888.
- (85) LANDSTEINER (K.) Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutiniierenden. Wirkungen des Blutserums und der Lymphs. *Zbl. Bakt.* 1 Abt. Orig. (1900), 27, 357-362.
- (86) LAURELL (C.B.) et ERIKSSON (S.) The electrophoretic α_1 globulin pattern of serum in α_1 anti-trypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1963), 132-140.

- (87) LAURELL (C.B.), KULLANDER (S.) et THORELL (J.) Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1968), 21, 337-343.
- (88) LAURELL (F.) Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.* (1965), 10, 358-361.
- (89) LIEBERMANN (J.) Heterozygous and homozygous α_1 anti-trypsin deficiencies in patients with pulmonary emphysema. *N. Engl. J. Med.* (1969), 281, 279-284.
- (90) LIEBERMANN (J.) α_1 anti-trypsin and pepsin inhibition. *N. Engl. J. Med.* (1971), 285, 524-525.
- (91) LIEBERMANN (J.), MITTMANN (C.), KENT (J.R.) Screening for heterozygous α_1 anti-trypsin deficiency III. A provocative test with diethylstilboestrol and effect of oral contraceptives. *J. A. M. A.* (1971), 217, 1198-1206.
- (92) LINDVALL (S.), MAGNUSSON (O.), ORTH (K.) On the inhibition of a fibrinolytic enzyme from *Aspergillus Orizae* by serum. *Acta Chem. Scand.* (1969) 23, 2165-2174.
- (93) LOOMIS (W.D.) et BATAILLE (J.) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.* (1965), 5, 423-438.
- (94) LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.) et RANDALL (R.J.) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951), 193, 265-275.
- (95) MAC COWN (B.H.), HALL (T.) et BECK (G.E.) Plant leaf and stem proteins isoenzymes and environmental change. *Plant Physiol.* (1969), 44, 210-216.
- (96) MACKO (V.A.), NOVACKY (A.) et STAHMANN (M.A.) Protein and enzyme patterns from uredospores of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *Phytopath.* (1967), 58, 122-127.
- (97) MARTIN (J.P.), VANDEVILLE (D.) et ROPARTZ (C.) Pi B, a new allele of α_1 anti-trypsin genetic variant. *Biomed. Express* (1973), 19, 395-398.

- (98) MARTIN (J.P.), VANDEVILLE (D.) et ROPARTZ (C.) α_1 anti-trypsin deficiency: Pi 0. *Lancet* (1973), *II*, 845.
- (99) MARTIN (J.P.), VANDEVILLE (D.), MARTIN (C.) et ROPARTZ (C.). Identification des phénotypes du système Pi et comparaison des méthodes de dépistage des déficits en α_1 anti-trypsin. *Ann. Biol. Clin.* (1974), *32*, 197-207.
- (100) MAURER (H.R.) Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel electrophoresis. *Ed. de Gruyter W. Berlin* (1971).
- (101) MEYER (J.A.), GARBER (E.D.) et SCHAEFFER (S.G.) Detection of esterases and phosphatases in culture filtrates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium xylarioides* by starch-gel zone electrophoresis. *Bot. Gaz.* (1964), *125*, (4), 298-300.
- (102) MEYER (J.A.) et MARAITE (H.) Unusual requirement for a vitamin by strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Nature* (1967), *216*, 70-71.
- (103a) MIEGE (M.N.) Signification taxonomique de la connaissance des protéines et acides nucléiques. *Candollea* (1968), *23*, (2), 229-256.
- (103b) MIEGE (M.N.) Valeur systématique des différences présentées par les protéines contenues dans les graines de plusieurs taxons de *Leucanthemum*. *Boissiera* (1971), *19*, 269-287.
- (104) MOREAU (F.) Les Champignons. (1952).
Ed. Paul Lechevallier
- (105) MOSER (M.) Ascomyceten, in Gams H. *Kleine Kryptogamenflora Innsbruck* 147 p.
- (106) MOSES (V.) et WILD (D.G.) Soluble protein profiles in *Escherichia Coli*. *Folia Microbiol.* (1969), *14*, (4), 305-309.

- (107) NEALSON (K.H.) et GARBER (E.D.) An electrophoretic survey of esterases, phosphatases and leucine-aminopeptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycologia* (1967), 59, 330-336.
- (108) PEDUZZI (R.) et TURIAN (G.) Analyse électrophorétique et immunochimique des protéines endocellulaires solubles du type sauvage de *Neurospora crassa* comparées à celles de l'un de ses mutants morphologiques. *C.R. Acad. Sci. Paris* (1970), 270, 196-198.
- (109) PERCIVAL (P.J.) Problems on electrophoretic proteinograms. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* (1970), 48, (2), 171-178.
- (110) POGACAR (P.) et JARECKI (R.) Isoelectric focusing using inorganic acid ampholytes. Advances of methods and theories, Biochemical and Clinical applications. *Ed. De Gruyter New-York* (1974) 300 p.
- (111) PORTER (C.A.), MOWAT (A.P.), COOK (P.J.), HAYNES (D.N.) et SHILKIN (K.B.) α_1 anti-trypsin deficiency and neonatal hepatitis. *Brit. Med. J.* (1972), 3, 435-439.
- (112) RILEY (R.F.) et COLEMAN (M.K.) Isoelectric focusing of proteins on polyacrylamid gels. *J. Lab. Clin. Med.* (1968), 72, 714-716.
- (113) ROUGE (P.) Intérêt de l'électrophorèse des protéines foliaires en systématique végétale. Thèse Pharmacie Etat. Toulouse. 1 vol. 94 pages. (1971).
- (114) SCHUMACHER (G.F.) et PEARL (M.J.) α_1 anti-trypsin in cervical mucus. *Fert. Steril.* (1968), 19, 91-99.
- (115) SHARP (H.), FREIER (E.) et BRIDGES (R.). α_1 globulin deficiency in familial infantile liver disease. *Pediat. Res.* (1968), 2, 298.

- (116) SHARP (H.L.), BRIDGES (R.A.), KRIVIT (W.) et FREIER (E.F.) Cirrhosis associated with α_1 anti-trypsin deficiency : a previously unrecognized inherited disorder. *J. Lab. Clin. Med.* (1969), 73, 934-939.
- (117) SCHECHTER (Y.), LANDAN (J.W.), DABROWA (N.) et NEWCOMER (V.D.) Comparative disc electrophoretic studies of proteins from Dermatophytes. *Sabouraudia* (1965), 5, 144-149.
- (118) SCHWICK (H.G.), HEIMBURGER (N.) et HAUPT (H.) Antiproteinasen des Human serums. *Z. Ges. Inn. Med.* (1966), 21, 193-198.
- (119) SHEEN (S.J.) Isozymic evidence bearing on the origin of *Nicotiana tabacum* L. *Evolution* (1972), 26, 143-154.
- (120) SHIPTON (W.A.) et FLEISCHMANN (G.) Disc electrophoresis of proteins from uredospores of races of *Puccinia coronata* sp. *avenae*. *Can. J. Bot.* (1969) 47, 1351-1358.
- (121) SMITH (C.M.) et SMITH (G.A.) An electrophoretic comparison of six species of *Yucca* and of *Hesperaloe*. *Bot. Gaz. London* (1970), 131, 201-205.
- (122) SMITH (I.) Chromatographic and electrophoretic Techniques. *Ed. Heinemann Londres* (1968), 1 vol. 524 p.
- (123) SMITHIES (O.) Comparison and combination of the starch gel and filter paper electrophoretic methods applied to human sera. *Biochem. J.* (1958), 68, 636-643.
- (124) SOLECKA (M.), ROSS (J.A.) et MILLIKAN (D.F.) Evidence of substances interfering with the Lowry test for protein in plant leaf tissue. *Phytochem.* (1968), 7, 1293-1295.
- (125) SOMMEREYNS (G.) et PARMENTIER (G.) Recherches sur une différenciation biochimique de deux formes physiologiques d'*Erysiphe graminis* D.C. *Parasitica* (1967), 23, (3), 79-89.
- (126) SVENSSON (H.) Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. *Acta Chem. Scand.* (1962), 15, 325-341.

- (127) TALAMO (R.C.), BLENNERHASSETT (J.B.) et AUSTEN (K.F.) Familial emphysema and α_1 anti-trypsin deficiency. *N. Engl. J. Med.* (1966), 275, 1301-1304.
- (128) TURNER (B.L.) Applications of chimiosystematic methods. *Bull. of the Nat. Inst. of Sci. of India* (1967), 34, 20-38.
- (129) TUTIN (T.G.), HEYWOOD (V.H.), VALENTINE (D.H.), BURGESS (N.A.), WALTERS (S.M.), WEBB (D.A.). *Flora Europaea. University Press, Cambridge* (1962) I, 29-35.
- (130) TUTIN (T.G.), HEYWOOD (V.H.), VALENTINE (D.H.), BURGESS (N.A.), WALTERS (S.M.), WEBB (D.A.). *Flora Europaea. University Press, Cambridge* (1972), III, 193-201.
- (131) UNGAR (I.A.) et BOUCAUD (J.) Comparison of seed proteins in the genus *Sueda* by means of disc gel electrophoresis. *Am. J. Bot.* (1974), 61, 325-330.
- (132) VAN LOON (L.C.) et VAN KAMMEN (A.) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun". *Phytochem.* (1968), 7, 1727-1735.
- (133) VAUGHAN (J.G.) et WAITE (A.) Comparative electrophoretic studies of the seed proteins of certain species of *Brassica* and *Sinapis*. *J. Exp. Bot.* (1966), 18, 100-109.
- (134) VESTERBERG (O.) Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. *Acta Chem. Scand.* (1966), 20, 820-834.
- (135) VESTERBERG (O.) et SMITH (C.J.) Isoelectric focusing. *Butterworths* Londres (1974), 212 pages.
- (136) VOGEL (R.), TRAUTSCHOLD (L.), WERLE (E.). *Natural proteinase inhibitors. Academic Press New York* (1968).

- (137) WATTS (R.L.) Proteins and Plant Phylogeny. *Phytochemical Phylogeny*
Ed. by Harborne J.B. (1970), p. 145-178.
- (138) WELCH (M.N.), REINECKE (M.E.) et HAMMARSTEN (J.F.) The signifi-
cance of intermediate levels of α_1 anti-trypsin. *Ann. Intern. Med.* (1969), 71, 533-542.
- (139) WERNER (D.), MARIO (W.) et ODENTHAL (J.) Serum protein changes after
gastrectomy as a model of acute phase reaction. *J. Lab. and Clin. Med.*
(1967), 70, 302-310.
- (140) WHITNEY (P.J.), VAUGHAN (J.G.) et HEALE (J.B.) A Disc electrophoretic
study of the Proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium Dahliae*
and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.*
(1968), 19, 415-426.
- (141) WRIGLEY (C.W.) Use of isoelectric focusing for separation of proteins
in biological fluids. *Science Tools* (1968), 15, 17-18.

-----0000000-----

